



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

**OPTIMALIZACE TECHNOLOGIE VÝROBY
ECHINACEOVÝCH KAPEK**

OPTIMIZATION OF ECHINACEA DROPS PRODUCTION TECHNOLOGY

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Jana Boberová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Jana Zemanová, Ph.D.

BRNO 2020

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1422/2019 Akademický rok: 2019/20
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Studentka: **Bc. Jana Boberová**
Studijní program: Chemie a technologie potravin
Studijní obor: Potravinářská chemie a biotechnologie
Vedoucí práce: **Ing. Jana Zemanová, Ph.D.**

Název diplomové práce:

Optimalizace technologie výroby echinaceových kapek

Zadání diplomové práce:

- Literární rešerše na téma:
 - Echinacea spp.
 - hlavní biologicky aktivní látky, jejich diverzita s ohledem na druh a různé části rostlin
 - možnosti jejich využití v potravinářství, farmacii, kosmetice
 - přehled metod pro stanovení hlavních účinných látek
- Příprava alkoholových extraktů rostlinného materiálu a zhodnocení různých technologických postupů s ohledem na obsah vybraných účinných látek.
- Vyhodnocení dosažených výsledků, diskuse a formulace závěrů práce.

Termín odevzdání diplomové práce: 31.7.2020:

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí diplomové práce.

Bc. Jana Boberová
student(ka)

Ing. Jana Zemanová, Ph.D.
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2020

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Tato diplomová práce se zabývá výrobou bylinných kapek z třapatkovky (*Echinacea*) a stanovením obsahu vybraných účinných látek.

Teoretická část obsahuje taxonomické zařazení echinacey, její botanickou charakteristiku a podmínky pěstování. Zmíněna je také historie pěstování a způsoby využití této rostliny. Důležitou kapitolou teoretické části je chemické složení rostliny a rozdíly ve složení mezi jednotlivými druhy třapatkovky. Dále jsou zmíněny metody získávání účinných látek a jejich stanovení. Poslední kapitola je věnována technologii výroby echinaceových kapek.

V experimentální části byla provedena optimalizace extrakce pro sušené květy a kořeny *E. purpurea*. Pro květy byl stanoven tento extrakční systém: 40% ethanol, čas 6 hodin, poměr navážky ku rozpouštědлу 1:10 a laboratorní teplota. Pro kořeny byl vyhodnocen jako nejlepší 20% ethanol, čas 24 hodin, poměr navážky 1:10 a laboratorní teplota. Dále byly připraveny nejlepší extrakty, u kterých byl stanoven obsah celkových fenolických látek v rozmezí 0,799–0,839 mg/ml, následně byla stanovena antioxidační aktivita v rozmezí 116–242 µg T/ml, a nakonec byla provedena analýza aromatických látek pomocí HS-SPME-GC-MS. Pro porovnání připravených extraktů byly testovány i dva komerční vzorky.

KLÍČOVÁ SLOVA

rod třapatkovka, bylinné extrakty, polyfenoly, antioxidační aktivita, aromatické látky

ABSTRACT

This diploma thesis deals with the production of herbal drops from Echinacea and the determination of the content of selected active substances.

In the theoretical part, the taxonomic classification of echinacea, its botanical characteristics and growing conditions are mentioned. The history of cultivation and uses of this plant are also mentioned. An important chapter of the theoretical part is the chemical composition of the plant and differences in composition between individual cultivars of Echinacea. Methods for obtaining active substances and their determination are also mentioned. The last chapter is devoted to the technology of production of echinacea drops.

In the experimental part, the extraction was optimized for dried flowers and roots of *E. purpurea*. The following extraction system was determined for the flowers: 40% ethanol, time 6 hours, weight to solvent ratio 1:10 and room temperature. For the roots, 20% ethanol and a time of 24 hours, a ratio of 1:10 and room temperature were evaluated as the best conditions. Furthermore, the best extracts were prepared, in which the content of total phenolic substances was set at 0.799-0.839 mg/ml, then the antioxidant activity was determined in the range from 116 to 242 µg T/ml, and finally the analysis of aromatic substances was performed by HS-SPME-GC-MS. Two commercial samples were also tested to compare the prepared extracts.

KEYWORDS

genus Echinacea, herbal extracts, polyphenols, antioxidant activity, aromatic substances

BOBEROVÁ, Jana. Optimalizace technologie výroby echinaceových kapek. Brno, 2020.
Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/123979>. Diplomová práce.
Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií.
Vedoucí práce Ing. Jana Zemanová, PhD.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Touto cestou bych chtěla poděkovat své vedoucí diplomové práce Ing. Janě Zemanové, Ph.D. za odborné vedení a cenné rady, které mi pomohly při zpracování této práce. Mé poděkování patří také Ing. Márii Ďubašákové za spolupráci na experimentu.

OBSAH

1	Úvod.....	8
2	Teoretická část.....	9
2.1	Původ a historie.....	9
2.2	Morfologie.....	9
2.3	Pěstování a sklizeň	12
2.4	Účinné látky	12
2.4.1	Kyselina kávová a její deriváty	13
2.4.1.1	Kyselina kávová	13
2.4.1.2	Kyselina kaftarová.....	14
2.4.1.3	Kyselina cichorová.....	14
2.4.1.4	Kyselina chlorogenová.....	15
2.4.1.5	Cynarin.....	15
2.4.1.6	Echinakosid	16
2.4.2	Těkavé sloučeniny a esenciální oleje	17
2.4.3	Flavonoidy.....	17
2.4.4	Alkylamidy.....	18
2.4.5	Polyacetyleny a polyeny.....	19
2.4.6	Polysacharidy a glykoproteiny	19
2.4.7	Ostatní látky	20
2.5	Terapeutické účinky	20
2.6	Metody získávání účinných látek z rostlinných materiálů	21
2.6.1	Používané extrakční metody pro rostliny Echinacea	21
2.7	Metody pro stanovení hlavních účinných látek.....	22
2.7.1	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC).....	22
2.7.2	Plynová chromatografie (GC)	23
2.7.3	Kapilární elektroforéza (CE).....	23
2.7.4	Infračervená spektroskopie (IR).....	24
2.8	Výroba doplňků stravy z echinacey	25
2.8.1	Doplňky stravy z echinacey a jejich formy	25
2.8.2	Technologie výroby echinaceových kapek	26
3	Experimentální část.....	27
3.1	Použité chemikálie	27
3.2	Použité přístroje a vybavení	27
3.3	Materiál	27
3.3.1	Komerční vzorky.....	28
3.4	Metody a postup práce	29
3.4.1	Optimalizace rozpouštědla a doby extrakce.....	29
3.4.2	Optimalizace navážky	30
3.4.3	Optimalizace teploty	31

3.4.4	Stanovení celkových fenolických látek pomocí Folin-Ciocalteuova činidla	31
3.4.5	Stanovení antioxidační aktivity	32
3.4.6	Stanovení aromatických látek pomocí HS-SPME-GC-MS	33
3.4.6.1	Příprava vzorků	34
3.4.6.2	Podmínky SPME extrakce	34
3.4.6.3	Podmínky GC-MS analýzy	34
3.4.6.4	Identifikace a kvantifikace prchavých látek ve vzorcích	34
3.5	Statistické zpracování výsledků	34
4	Výsledky a diskuze.....	35
4.1	Optimalizace rozpouštědla a doby extrakce.....	35
4.2	Optimalizace navážky	40
4.3	Optimalizace teploty	42
4.4	Stanovení celkových fenolických látek ve vybraných vzorcích	44
4.5	Stanovení antioxidační aktivity ve vybraných vzorcích	46
4.6	Stanovení aromatických látek ve vybraných vzorcích.....	47
5	Závěr.....	51
6	Zdroje	53
7	Seznam příloh.....	60
8	Přílohy	61

1 ÚVOD

Echinacea je jednou z nejprodávanějších léčivých rostlin široce používaných ke zmírnění nachlazení, bolesti v krku a jiných infekcí horních cest dýchacích. V dnešní době se převážně využívají 3 druhy této rostliny, a sice třapatkovka nachová (*Echinacea purpurea*), třapatkovka úzkolistá (*Echinacea angustifolia*) a třapatkovka bledá (*Echinacea pallida*). V Evropě se tyto rostliny pěstují hlavně v Německu, Nizozemsku a Rumunsku.

Terapeuticky jsou využívány nadzemní části rostlin i kořeny. Připravené produkty (např. infuze, tinktury a tobolky) se používají ke stimulaci imunitního systému a jejich imunostimulační vlastnosti jsou přisuzovány hlavně derivátům kyseliny kávové, alkylamidům, polysacharidům a glykoproteinům. Kyselina cichorová se proto také běžně používá jako marker pro stanovení kvality léčiv z echinacey [1–3].

V současnosti se vývoj zaměřuje na aplikace technik přípravy vzorků a separačních metod. Zatímco chromatografické separační metody jsou poměrně jednotné, existuje mnoho možností přípravy vzorků. Předmětem výzkumu získávání aktivních látek z echinacey je vliv různých rozpouštědel a jejich koncentrace, tlaku a teploty, dále doba extrakce a případně opakování celého procesu. Svou roli také hraje použitý druh a části rostliny (kořen, nať, květ) [4].

Cílem této diplomové práce je příprava alkoholových extraktů rostlinného materiálu ve vhodném extrakčním systému (rozpuštědlo, čas, navážka, teplota) a stanovení obsahu účinných látek.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Původ a historie

Echinacea byla známa již původním obyvatelům Severní Ameriky, avšak první písemnou zmínku o této rostlině najdeme v knize s názvem *Flora Virginica*, kterou publikoval L. T. Gronovius v roce 1762. Tato kniha byla založena na terénních výzkumech anglického botanika Johna Claytona, který žil čtyřicet let ve Virginii, kde se setkal s druhem *Echinacea purpurea* a ve svých poznámkách uvádí, že tato rostlina byla používána k ošetření odřenin u koní.

Další zmínka pochází z roku 1830, kdy dobrodruh Raffinesque zaznamenal, že Siouxové používají rostlinu *Echinacea angustifolia* k léčbě syfilidy. O pět let později botanik jménem Riddell napsal o echinaceji, že je účinná proti nadýmání. V roce 1837 začali rostliny sbírat shakeři (náboženská sekta původně z Anglie) a využívat jako lék na nemoci močových cest.

Na začátku 20. století se spojila skupina jednotlivců a požádala Kongres, aby byl vytvořen úřad pro registraci indiánských znalostí. Kongres na jejich žádost ustavil úřad pro americkou etnologii, který měl za úkol zdokumentovat indiánskou kulturu, než bude navždy ztracena. V rámci tohoto projektu byli do terénu vysláni badatelé, kteří cestovali po Státech a zaznamenávali informace od potomků slavných indiánských kmenů. Díky těmto lidem dnes víme spoustu informací o tom, jak indiáni využívali echinaceu v léčitelství. Příklady těchto využití spadají do tří základních kategorií, a sice urychlování hojení, tlumení bolesti a léčení infekčních nemocí.

Do Evropy se věhlas o třapatkovce donesl v průběhu 20. století. Nejprve se používal pouze kořen *E. angustifolia*, ale postupně se začaly využívat jak ostatní části rostliny, tak i další druhy této rostliny. Echinacea byla rozsáhleji zkoumána především v Německu, kde nyní zaujímá místo mezi hlavními léky, více než 250 produktů s obsahem echinacey je dostupných v této zemi [1, 5].

2.2 Morfologie

Rostliny rodu *Echinacea* (zařazení do taxonomie je uvedeno v Tabulce 1) jsou okrasné trvalky pocházející ze Severní Ameriky, kde se vyskytují planě. Mezi významné druhy patří *Echinacea purpurea* (třapatkovka nachová, Obrázek 1), *Echinacea angustifolia* (třapatkovka úzkolistá, Obrázek 2) a *Echinacea pallida* (třapatkovka bledá, Obrázek 3).

Pojmenování „*Echinacea*“ bylo odvozeno z řeckého slova „*echinos*“ – ježek, zřejmě podle toho, že květní terč je pichlavý [5]. Další používaný název pro tuto rostlinu je „*Rudbeckia*“ podle švédského botanika Olafa Rudbecka. Původně rod *Rudbeckia* zahrnoval i rostliny rodu *Echinacea*, proto tento rod je v češtině označován jako „třapatkovka“ i „třapatka“ [6].

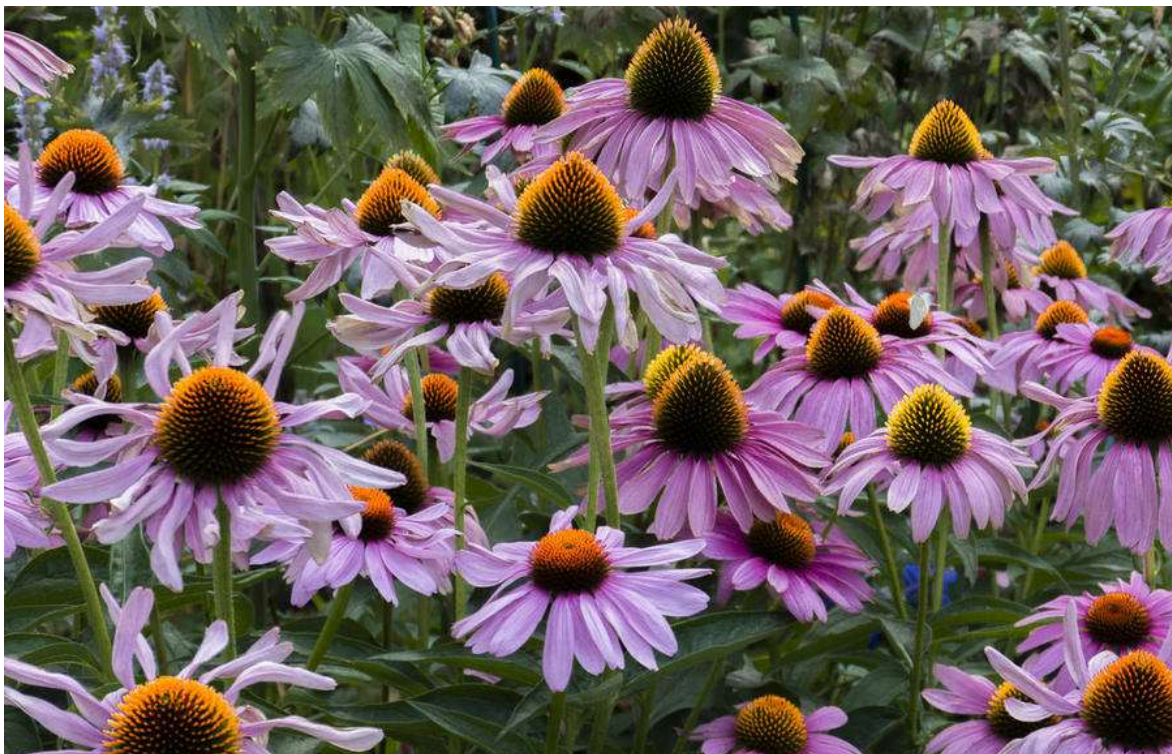
Kořeny této byliny jsou světle hnědé, silné až 4 cm, dlouhé až 60 cm a tvoří svazky. Lodyhy dorůstají výšky 70 až 120 cm, jsou vzpřímené, olistěné a nesou po jednom úboru. Listy jsou ve spodní části lodyhy řapíkaté, téměř přisedlé a okraj listů je zubatý. Květenství je tvořeno purpurovými, jazykovými květy na okraji dlouhými asi 40-60 mm a trubkovitými květy na kuželovitém terči rudohnědé barvy. Plodem jsou nažky se zakrnělým chmýřem, které po uschnutí rostliny opadají [3, 5, 7].

Tabulka 1 Taxonomické zařazení [6]

Říše:	rostliny (<i>Plantae</i>)
Podříše:	cévnaté rostliny (<i>Tracheobionta</i>)
Oddělení:	krytosemenné (<i>Magnoliophyta</i>)
Třída:	vyšší dvouděložné rostliny (<i>Rosopsida</i>)
Řád:	hvězdnicotvaré (<i>Asterales</i>)
Čeleď:	hvězdnicovité (<i>Asteraceae</i>)
Rod:	třapatkovka (<i>Echinacea</i>)



Obrázek 1 *Echinacea purpurea* [8]



Obrázek 2 *Echinacea angustifolia* [9]



Obrázek 3 *Echinacea pallida* [10]

2.3 Pěstování a sklizeň

E. purpurea byla v Evropě kultivována nejdříve jako okrasná květina, dnes ovšem existuje celá řada okrasných forem tohoto druhu jako například „Kráľ“, „Večerní hvězda“ nebo „Sombbrero“. Později se hlavně v Německu začalo s pěstováním třapatky pro farmaceutické účely.

Třapatkám se daří ve výsluní až v polostínu. Pro pěstování se doporučuje lehčí, nekamenitá, hluboká humózní půda. Také by půda měla být vlhká, ale neměla by zadržovat vodu.

Echinacea se velmi dobře množí semeny. Ideální doba pro výsev je v únoru až březnu a doporučují se teploty mezi 20 až 25 °C, tedy je vhodné si rostlinky předpěstovat ve skleníku. Pro zlepšení vzcházení semen se doporučuje, aby sazenice prošly otužovací fází bez mrazu, a sice chlazením semen při 0 °C po dobu jednoho měsíce nebo namočením ve vodě po dobu 24 hodin. Výsadbu na venkovní stanoviště lze provádět od dubna.

Sklizeň kvetoucí nati lze provádět od prvního roku pěstování, *E. purpurea* kvete v prvním roce v říjnu, od druhého roku v červenci až srpnu. Nadzemní část rostliny se sklízí v plném květu. Kořeny se sklízí vyorávačem minimálně z dvouletých rostlin v pozdním podzimu. Kořeny se před sušením musí očistit a rozdělit a suší se při teplotě maximálně do 45 °C [5, 7].

2.4 Účinné látky

Látky obsažené v rostlinách rodu *Echinacea* tvoří neobyčejnou pestrou směs. Jednotlivé druhy třapatky mají podobný účinek, ale jiné složení. V zásadě je to proto, že žádná jednotlivá složka není zodpovědná za účinky echinacey, ale celá skupina látek. Například glykosidická látka echinakosid je přítomna pouze v *E. angustifolia*, ale chybí v *E. purpurea*. U jiných látek je tomu naopak a tyto rozdíly jsou uvedeny v Tabulce 2. Obecně se v těchto rostlinách objevují fenolické sloučeniny (deriváty kyseliny kávové), fenolický glykosid echinakosid, cynarin, nenasycené alifatické sloučeniny a polysacharidy. Dalšími obsahovými látkami jsou lipofilní složky alkylamidy a polyacetyleny, silice, anthokyany a stopy pyrolidizinových alkaloidů [5, 11].

Tabulka 2 Hlavní složení různých druhů rostliny *Echinacea* [12]

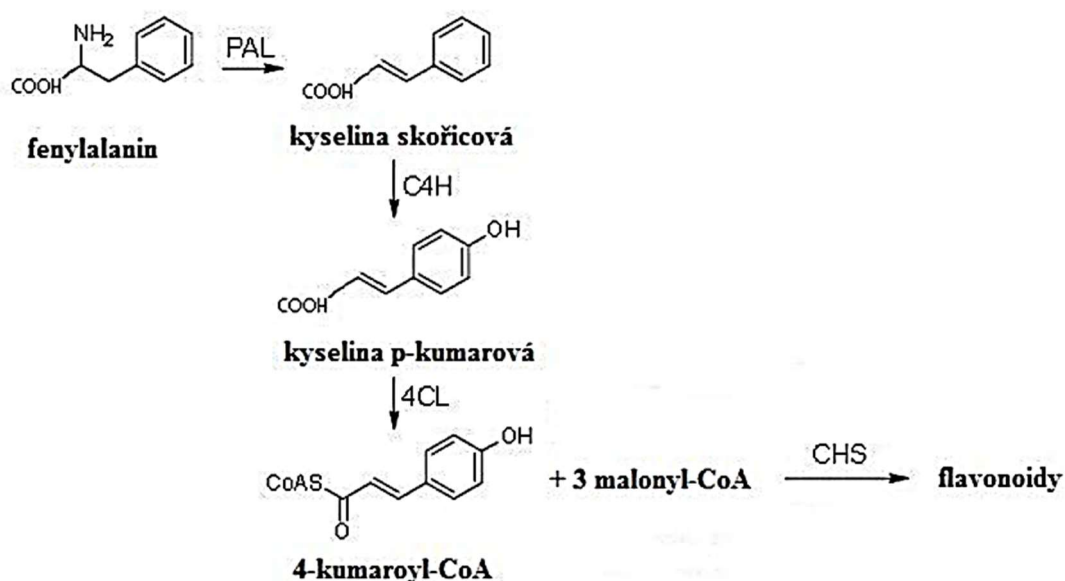
druh	složení	komentář
<i>E. purpurea</i>	alkylamidy, estery kyseliny kávové, hlavně kyselina cichorová, polysacharidy, polyacetyleny	echinakosid není přítomný
<i>E. angustifolia</i>	alkylamidy, estery kyseliny kávové, částečně echinakosid, cynarin, polysacharidy, polyacetyleny	cynarin je typický
<i>E. pallida</i>	estery kyseliny kávové, částečně echinakosid, polysacharidy, polyacetyleny	alkylamidy do značné míry chybí

Také složení kořene a nadzemních částí rostliny je poměrně odlišné. V kořenech je více těkavých olejů a pyrolizidenových alkaloidů, jako je například tussilagin. V těchto částech se nachází více derivátů kyseliny kávové a kyseliny ferulové a také komplexních polysacharidů. Obsah jednotlivých složek je ovšem velmi variabilní a závisí na několika endogenních a exogenních faktorech, včetně genetických znaků, rostlinných orgánů (listy, květy, stonky,

kořeny), klimatických podmínkách, podmínkách pěstování, zpracování a skladování. Velmi důležitou roli tedy představuje standardizace získávání extraktů [13, 14].

2.4.1 Kyselina kávová a její deriváty

Deriváty kyseliny kávové jsou typicky syntetizovány fenylypropanoidovou cestou (Obrázek 4), ve které fenylyalanin amoniakální lyáza (PAL) hraje klíčovou roli v odlišné produkci primárních a sekundárních metabolitů. Mezi tyto metabolity obsažené v echinaceji patří kyselina kaftarová, kyselina cichorová, kyselina chlorogenová, cynarin a echinakosid [2].



Obrázek 4 Fenylypropanoidová dráha [15], C4H – cinamát-4-hydroxyláza, 4CL – 4-kumaryloyl-CoA-ligáza, CHS - chalkonsyntáza

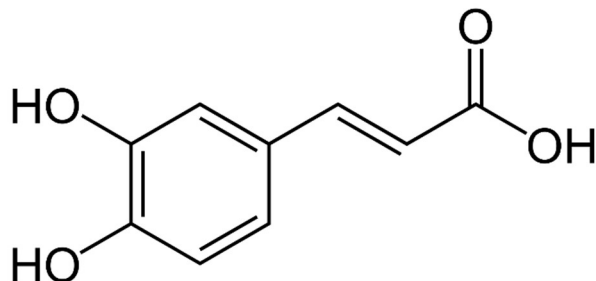
Každý druh třapatky obsahuje různou směs těchto derivátů. Echinakosid je hlavní složkou kořenů *E. angustifolia* a *E. pallida* (0,5–1,0 %) a kyselina cichorová je hlavní složkou kořenů *E. purpurea* s obsahem 0,14–2,05 % a u nadzemních částí rostliny s obsahem až 1,2–3,1 %. Cynarin je přítomen pouze v kořenech *E. angustifolia* a u ostatních dvou se nevyskytuje [12].

Deriváty kyseliny kávové patří mezi fenolické látky, kterým se připisují antioxidační vlastnosti. Zvláště kyselina cichorová se dvěma sousedními hydroxylovými skupinami svých fenolových kruhů vykazuje vysokou schopnost zachytávání radikálů. Podle Tsai a spol. [2] je pořadí účinnosti proti volným radikálům následující: echinakosid > kyselina cichorová > cynarin > kyselina chlorogenová > kyselina kávová > kyselina kaftarová.

2.4.1.1 Kyselina kávová

Kyselina kávová neboli kyselina 3,4-dihydroxyskořicová (Obrázek 5) je hnědá krystalická látka za laboratorní teploty, přirozeně se nachází v mnoha rostlinách, ve stravě se nachází především jako součást ovoce, čaje, kávy a vína. Jedná se o látku, která má potenciální antioxidační, protizánětlivé a antineoplastické účinky. Kyselina kávová společně s kyselinou chlorogenovou (viz kap. 2.4.1.4) mohou vyvolat biologické účinky v krevním oběhu, a sice tyto kyseliny

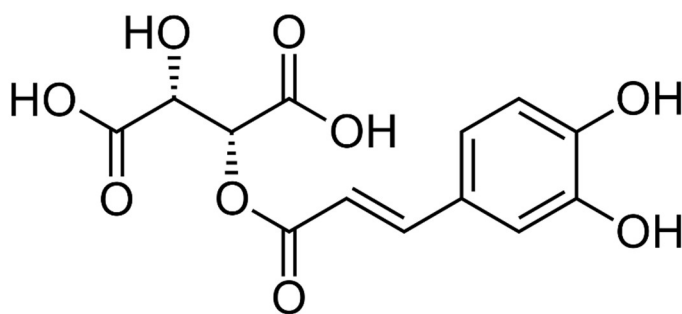
inhibují oxidaci lipoproteinů s nízkou hustotou (LDL), a proto mohou chránit před kardiovaskulárním onemocněním. Obě tyto kyseliny jsou také antioxidanty a mohou inhibovat tvorbu mutagenních a karcinogenních nitrososloučenin [1, 2, 16]. Obsah kyseliny kávové v *Echinacea purpurea* může dosahovat až 60 mg/100 g sušené rostliny [17].



Obrázek 5 Kyselina kávová [18]

2.4.1.2 Kyselina kaftarová

Kyselina kaftarová (Obrázek 6) je ester kyseliny kávové a vinné. Jedná se o neflavonoidní fenolickou sloučeninu, která se hojně nachází v hroznech a ovlivňuje barvu bílého vína. Přítomnost dvojné vazby na bočním řetězci vede k existenci dvou izomerních forem. V hroznech se vyskytuje hlavně v trans konfiguraci a je převážně obsažena v dužnině a během lisování hroznů se rychle uvolňuje do šťávy. Ve 200 ml takto získané šťávy se může nacházet až 60 mg kyseliny kaftarové [19]. Také se tato kyselina vyskytuje ve špenátu, salátu, čekance a je jednou z bioaktivních složek *Echinacea purpurea*. V extraktech získaných z této rostliny se obsah kyseliny kaftarové pohybuje v rozmezí 50–80 mg/g extraktu [2, 16, 20].

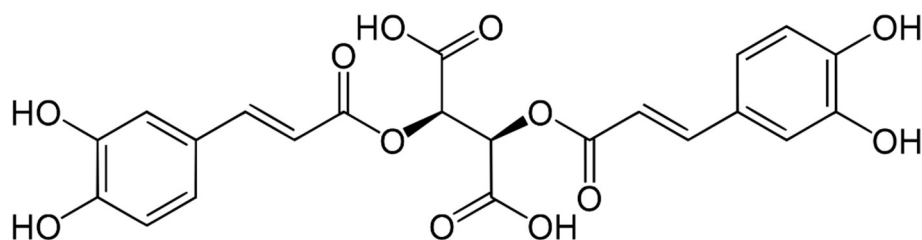


Obrázek 6 Kyselina kaftarová [21]

2.4.1.3 Kyselina cichorová

2,3-dikafeylester kyseliny vinné (Obrázek 7) byl poprvé izolován z rostliny *Cichorium intybus*, a proto se tato sloučenina nazývá jako kyselina cichorová. Její obsah v kořenech třapatky dosahuje až 20 mg v 1 g sušiny [5]. Tato kyselina se často využívá jako marker pro kontrolu kvality rostlinných produktů původem z čekanky (*Cichorium intybus*), třapatky purpurové a bazalky. Obsah kyseliny cichorové v čekance se pohybuje v rozmezí 200–1500 µg/g čerstvých

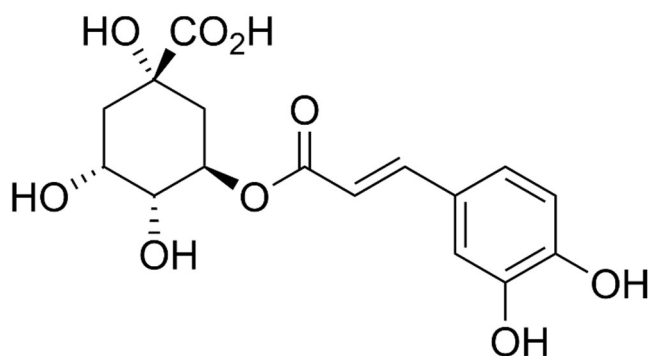
listů [22], v bazalce může být obsah této kyseliny od 11 do 25 mg/100 g sušené rostliny [17]. Mezi hlavní benefity cichorové kyseliny patří antivirové, protizánětlivé a antioxidační účinky [23].



Obrázek 7 Kyselina cichorová [24]

2.4.1.4 Kyselina chlorogenová

Kyselina chlorogenová (Obrázek 8) je strukturálně ester kyseliny kávové s 3-hydroxylovou skupinou kyseliny chinové. Káva je zdrojem této kyseliny v lidské stravě, denní příjem se pohybuje v rozmezí od 0,5 do 1 g za den [16]. Ti, kteří kávu nepijí, mohou tuto kyselinu získávat z dalších zdrojů, jako jsou například jablka, hrušky, artyčoky a lilky. Tato sloučenina, dlouho známá pouze jako antioxidant, také zpomaluje uvolňování glukózy do krevního řečiště po jídle [25]. Tajik a spol. [26] uvádí, že kyselina chlorogenová má pozitivní efekt na cukrovku typu 2, obezitu, Alzheimerovu chorobu a mozkovou mrtvici. Také uvádí nepříznivé účinky této sloučeniny, mezi které patří bolesti hlavy, průjemy a komplikace ve vyšších dávkách pro osoby s citlivým žaludkem.

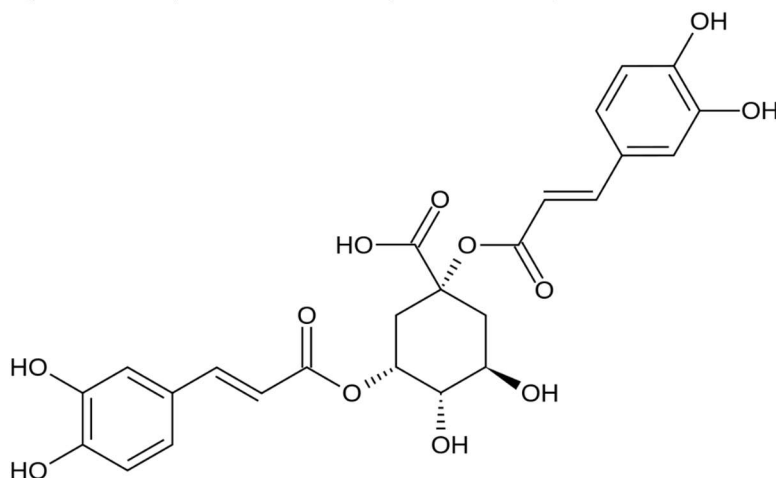


Obrázek 8 Kyselina chlorogenová [27]

2.4.1.5 Cynarin

Cynarin (Obrázek 9) je ester tvořený kyselinou chinovou a dvěma jednotkami kyseliny kávové. Jedná se o bioaktivní látku v artyčocích, u třapatků se nachází pouze v *E. angustifolia*, neobsahuje ji tedy žádný jiný druh tohoto rodu. Podle výzkumů [28, 29] pozitivně účinkuje na játra a chrání je před poškozením, také byly prokázány účinky cholagogické (zvyšování vylučování žluče ze žlučníku), choleretické (zvyšování tvorby žluče v játrech),

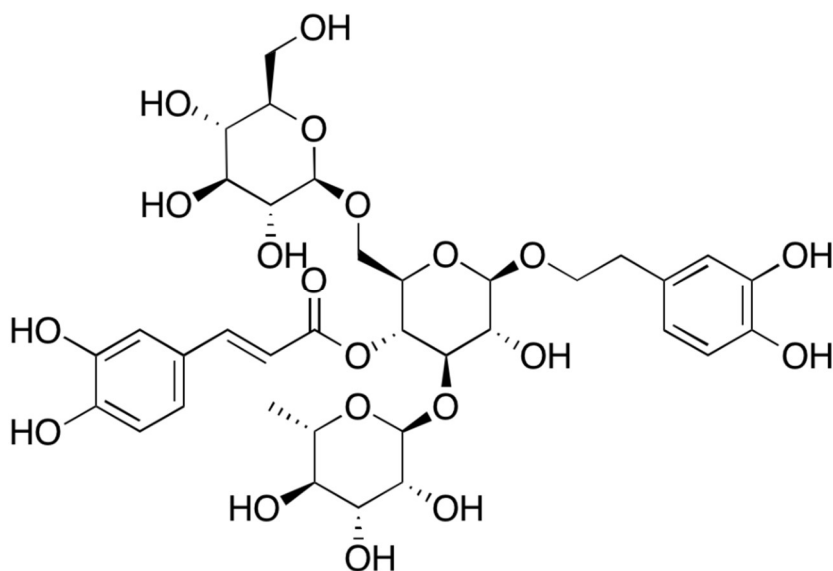
cholesterolytické (odbourávání cholesterolu), hypocholesterolytické (snižování hladiny cholesterolu) a hypolipidemické (snižování hladiny tuků v krvi) [1, 30].



Obrázek 9 Cynarin [31]

2.4.1.6 Echinakosid

Echinakosid (Obrázek 10) je tvořen z trisacharidu sestávajícího ze dvou glukózových a jedné rhamnózové části glykosidicky vázané k jednomu zbytku kyseliny kávové a jednomu zbytku hydroxytyrosolu. Tato sloučenina vykazuje slabé antibiotické účinky proti zlatému stafylokoku a proti streptokokům [5]. Také bylo zjištěno, že vykazuje neuroprotektivní aktivity [32]. Echinakosid se hromadí v kořenech *E. angustifolia* a *E. pallida*, ale *E. purpurea* tuto látku vůbec neobsahuje. V tradiční čínské medicíně se pro léčbu ledvin využívá rostlina *Cistanche*, ve které je echinakosid jedním z hlavních fenylethanoidních glykosidů [1, 5, 32].



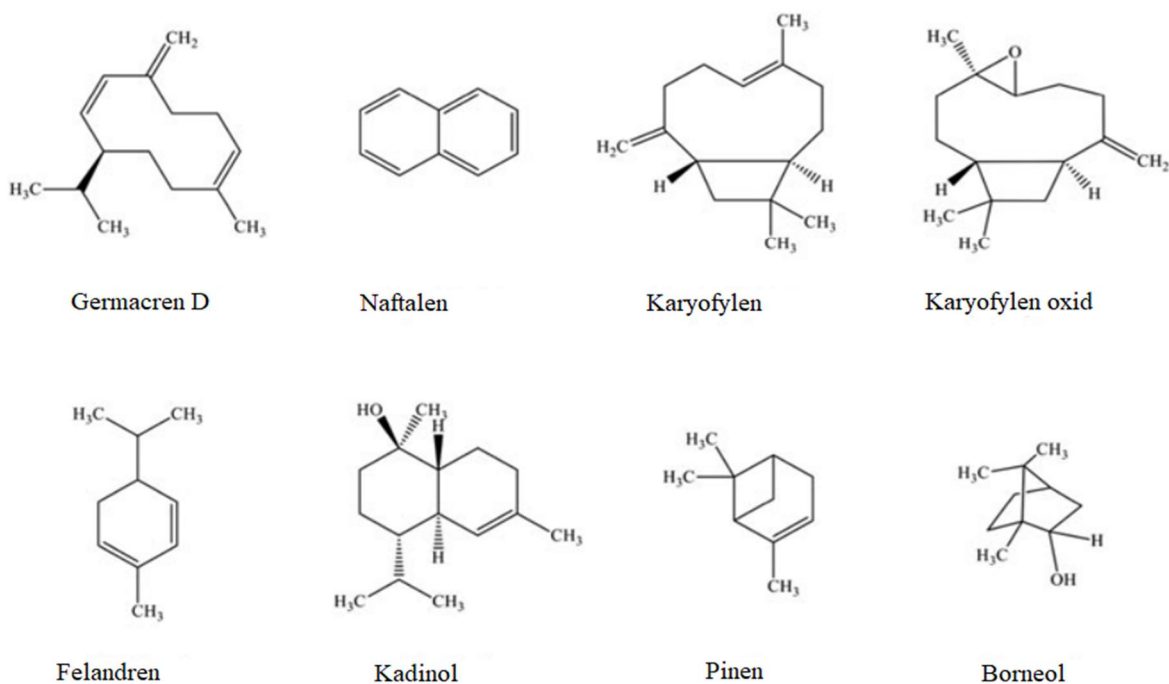
Obrázek 10 Echinakosid [33]

2.4.2 Těkavé sloučeniny a esenciální oleje

Je dobře známo, že těkavé sloučeniny z rostlin slouží jako látky přitahující hmyz. Obecně platí, že obsah esenciálních olejů v čerstvém materiálu představuje 0,05 až 0,48 %, u sušených materiálů to je v rozmezí 0,1 až 1,25 %. Chemické složení esenciálních olejů se může lišit jak mezi jednotlivými druhy, tak i mezi částmi jednotlivých rostlin [12, 14].

Hlavní komponenty esenciálních olejů z třapatkovky jsou terpeny, konkrétně monoterpeny ($C_{10}H_{16}$), seskviterpeny ($C_{15}H_{24}$) a jejich deriváty. Mezi tyto monoterpeny patří pinen, sabinen, myrcen, felandren a cymen. Ze seskviterpenů se v echinaceji objevují elemen, karyofylen, humulen, kurkumen, germacren D a kadinen. Obsah terpenů v olejích získaných z květů se pohybuje v rozmezí 88–93 %. Také se v esenciálních olejích vyskytují alkoholy, aldehydy a ketony. Vybrané sloučeniny jsou zobrazeny na Obrázku 11 [34, 35].

Kořen *E. pallida* obsahuje převážně alkeny (jako polyeny) a alkyny (jako polyacetyleny). Tyto sloučeniny jsou nestabilní a snadno oxidují na 8-hydroxyderiváty. Alkeny *E. pallida* a *E. purpurea* jsou velmi odlišné od *E. angustifolia*, kde se nachází především alkylketony [12, 14].



Obrázek 11 Hlavní komponenty esenciálních olejů echinacey [14]

2.4.3 Flavonoidy

Některé publikace [4, 17] uvádějí, že listy třapatky jsou bohaté na flavonoidy. Jako účinné antioxidanty ruší řetězové reakce vzniklých volných radikálů. Také mohou zasahovat do různých pochodů, a tedy mohou být důležité i jako prevence proti takovým druhům onemocnění, jako jsou například kardiovaskulární nemoci. Vykazují také protizánětlivý vliv, protinádorovou aktivitu, antitrombotický efekt a jsou účinné jako antivirové látky [36].

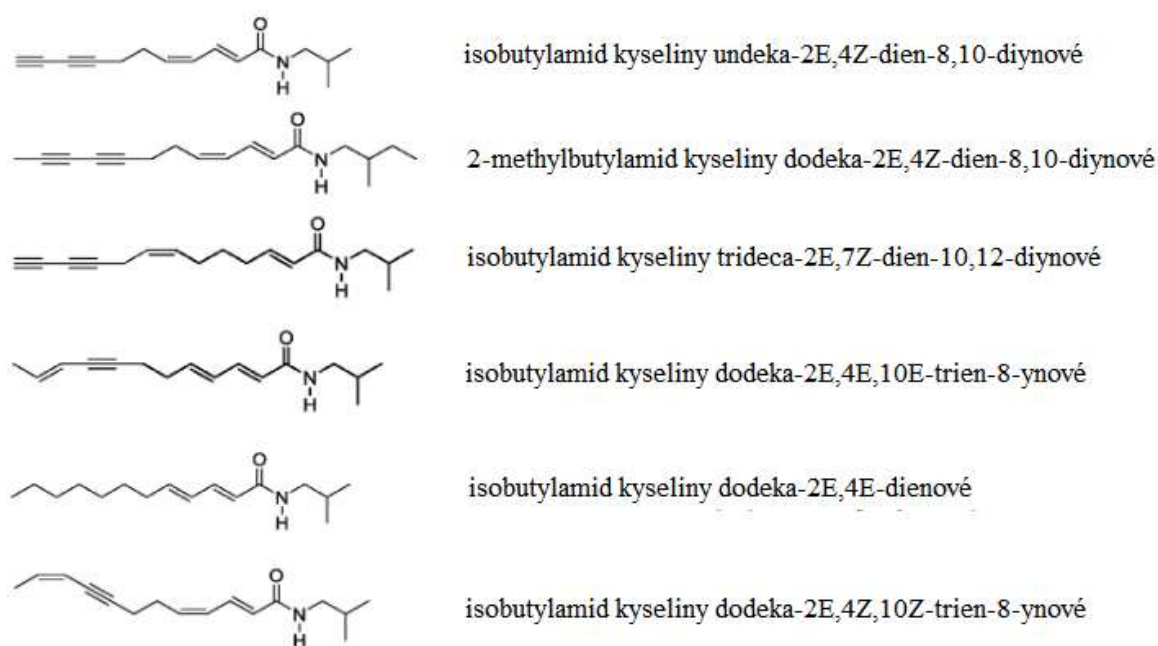
Mezi flavonoidy, které se vyskytují v rostlinách *Echinacea*, patří kvercetin, kaempferol, isorhamnetin a luteolin. Jejich vlastnosti jsou [5, 12]:

- Kvercetin: protialergické a antioxidační účinky, účinkuje proti anafylaktickému šoku, dermatitidě, proti viru chřipky a také ničí HIV a retroviry.
- Kaempferol: protizánětlivý, antioxidační, antihistaminický, účinkuje proti nádorům a vředům.
- Luteolin: protizánětlivý, antioxidační, antihistaminický, antispasmodický.

2.4.4 Alkylamidy

Třapatkovky obsahují více než 25 alkylamidů, převážně isobutylamidy mastných kyselin s přímým řetězcem (viz Obrázek 12), které v rostlině vznikají jako polyyny v biosyntetickém cyklu kyseliny olejové. *E. purpurea* a *E. angustifolia* obsahují v kořenech i v květech izomerní isobutylamid kyseliny tetraenové, ale *E. pallida* jej neobsahuje vůbec. Isobutylamidy z kořenů *E. angustifolia* obsahují hlavně 2-monoenové jednotky, zatímco z *E. purpurea* obsahují hlavně 2,4-dienoové jednotky a obsah alkylamidů v tomto druhu rostliny se udává v rozmezí 0,01 až 0,04 % [5, 12].

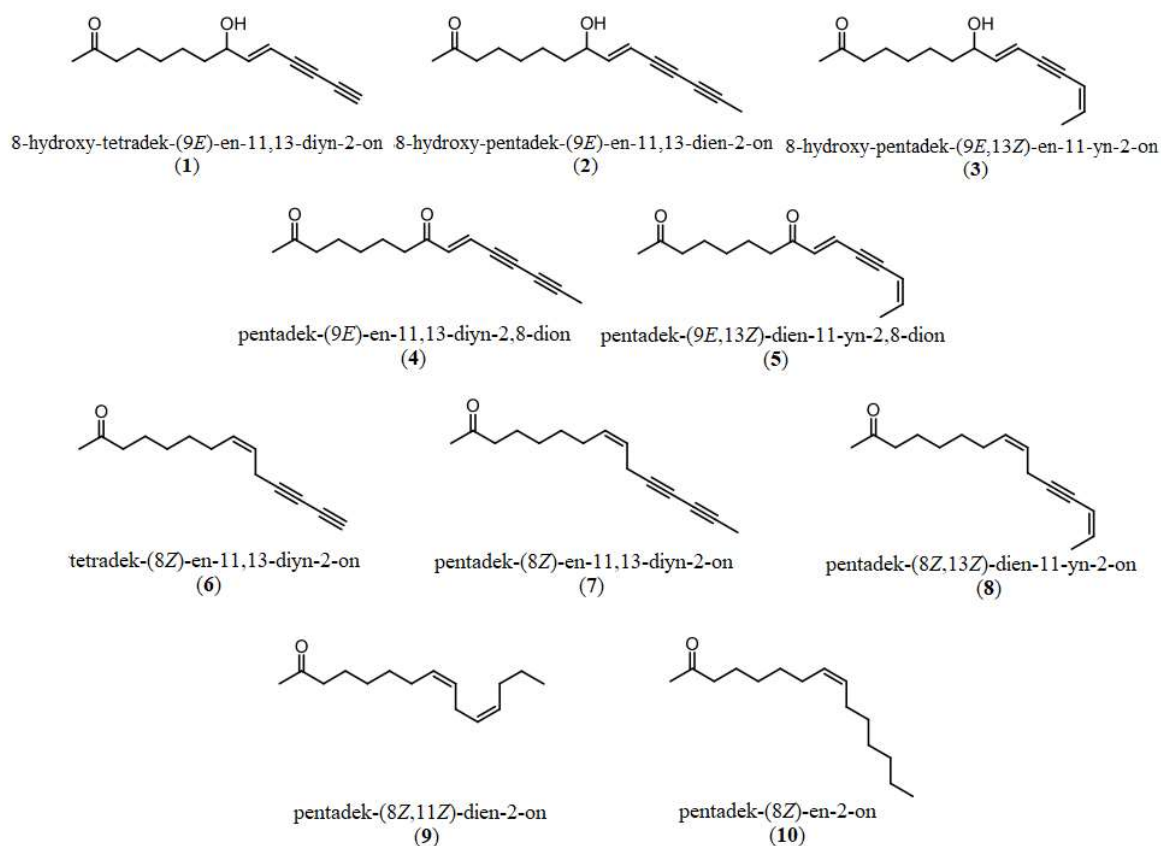
Alkylamidy byly používány jako anestetické sloučeniny domorodými Američany a bylo také zjištěno, že mají insekticidní a onkolytické účinky. Jsou také primárními složkami, o nichž se předpokládá, že jsou zodpovědné za protizánětlivou aktivitu echinacey. V současné době se předpokládá, že tyto imunomodulační účinky jsou způsobeny schopností alkylamidů vázat se na typ kanabinoidních receptorů 2 (CB2). Alkylamidy z echinacey jsou také schopné potlačit T-lymfocyty, které jsou klíčovými mediátory antivirové imunity, a vykazují aktivitu proti viru herpes simplex, chřipkovému viru a rhinoviru [4].



Obrázek 12 Struktura některých alkylamidů obsažených v echinaceji [4]

2.4.5 Polyacetyleny a polyeny

Kromě alkyalimidů je známo, že druhy třapatkovek obsahují další lipofilní sloučeniny, včetně skupiny polyacetylenů a polyenů. Pro rostliny čeledi *Asteraceae* jsou tyto látky typické. Větší množství se nachází v kořenech rostlin [5]. První dva hydroxylované acetyleny (sloučeniny č. 2 a 3 v Obrázku 13) byly izolovány z kořenů *E. pallida* v roce 1987. Později bylo při hledání biologicky aktivních sloučenin z rostlin rodu *Echinacea* zjištěno, že lipofilní extrakt z kořenů *E. pallida* má vyšší antiproliferativní aktivitu ve srovnání s ostatními testovanými druhy. Nakonec v letech 2006–2008 bylo zjištěno, že kořeny tohoto druhu obsahují tři hydroxylované acetyleny (1–3), dva dikarboxylové acetyleny (4, 5), tři monokarboxylové acetyleny (6–8) a dva monokarboxylové alkeny (9, 10), viz Obrázek 13 [4].



Obrázek 13 Chemická struktura polyacetylenů a polyenů obsažených v rostlinách *Echinacea* [4]

2.4.6 Polysacharidy a glykoproteiny

Polysacharidy a glykoproteiny z druhů *Echinacea* byly studovány roky s ohledem na jejich imunomodulační aktivitu v reakci na infekce nebo zranění. Mezi polysacharidy obsažené v echinaceji patří fruktan inulinového typu, kyselý arabinogalaktan, xyloglukan a rhamnoarabinogalaktan [4].

Pokud jde o glykoproteiny, v roce 2000 byly izolovány různé druhy arabinogalaktanproteinu (AGP) [37]. Stejní autoři v roce 2005 [37] klasifikovali tento AGP jako glykoprotein bohatý na hydroxyprolin. Další autoři [38], pracující na kořenech *E. pallida*, byli schopni izolovat jak

AGP, tak i arabinan, u kterého byla prokázána schopnost vázat lymfocyty, monocyty a granulocyty. Tyto leukocyty byly samostatně analyzovány pomocí průtokové cytometrie.

2.4.7 Ostatní látky

Kromě všech výše uvedených sloučenin zahrnují další složky echinacey fytosteroly, alkany a anorganické prvky, jako jsou draslík, vápník, hořčík a železo (III) [13, 14]. V ethanolových extraktech *E. purpurea* byly nalezené i další látky, a sice pryskyřice, sacharóza a redukující cukr. V čerstvých listech byl také zjištěn obsah vitamínu C (0,214 % po přepočítání na sušinu). Vedle těchto látek, jejichž struktura je objasněna, existuje ještě celá řada sloučenin, které zatím nemají zcela prozkoumanou a popsanou strukturu [5].

2.5 Terapeutické účinky

Jak už bylo uvedeno výše v kapitole 2.1, domorodí tradiční léčitelé původních severoamerických kmenů předepisovali různé přípravky *E. angustifolia*, *E. purpurea* a *E. pallida* pro úlevu od bolesti, od zánětů na kůži, k léčbě ran, jako protijed proti hadímu uštknutí a také pro symptomy spojené s nachlazením a infekčními nemocí. Moderní zájem o rod *Echinacea* se zaměřuje především na imunomodulační aktivitu. *Echinacea* je k dostání v nejrůznějších lékových formách, většinou v podobě tablet, které tvoří práškový kořen, nikoli extrakt z rostliny. Extrakty jsou ale také velmi používanými přípravky a jedná se především o ethanolové tinktury kořenů a natí [12].

Bylo provedeno několik studií [39], které zkoumaly schopnost echinacey zabránit nemoci, ale výsledky ukazují malý nebo nulový přínos. Proto se doporučuje její konzumace na začátku nemoci při počátečních příznacích především nachlazení a chřipky.

Účinnost aktivních látek třapatky byla zkoumána na testech *in vitro*, ale také na testech na zvířatech i na lidech. Metodou *in vitro* bylo zjištěno, že deriváty kyseliny kávové mají ochranné účinky na pojivovou tkáň kůže, a sice že chrání kolagen před poškozením způsobeným superoxidy a hydroxylovými radikály vytvořenými v xanthinovém systému [13].

Série studií u myši s použitím purifikovaných polysacharidů z echinacey vykazovaly stimulační účinek při aplikaci na imunitní buňky intraperitoneálně. Tyto účinky zahrnovaly zvýšení fagocytózy, chemotaxe a oxidační vzplanutí neutrofilů nebo makrofágů.

Testy na lidech mají obecně dva formáty, 1) leukocyty se izolují z periférií, a pak se ošetří s extraktem z echinacey *ex vivo* nebo 2) se vezme extrakt a leukocyty se izolují, aby se poté změřila jejich specifická funkce. Jedna studie [40] provedená *ex vivo* uvádí, že *echinacea* zvýšila chemotaxe neutrofilů a baktericidní aktivitu proti stafylokokům. V jiné studii [41] byly mononukleární buňky periferní krve izolovány od zdravých dospělých jedinců a od dospělých jedinců se syndromem chronické únavy nebo AIDS. Sušené a mleté buňky echinacey byly homogenizovány v buněčném kultivačním médiu a inkubovány s mononukleárními buňkami krve. Výsledkem bylo zvýšení schopností NK buněk (*natural killer cells*) zabíjet K562 leukemické buňky.

Echinacea má tedy schopnost posílit reakce fagocytární imunitních buněk, ale pouze některé přípravky jsou schopny takto učinit, jako například čerstvé lisované šťávy nebo izolované polysacharidy [5, 13, 14].

2.6 Metody získávání účinných látek z rostlinných materiálů

Úprava vzorku před samotným stanovením analytu je nejdůležitější úkon, který vede ke konečnému zjištění obsahu látky v matrici. Základní typy extrakcí, kdy je žádaná látka převedena z tuhé fáze do kapaliny, jsou [5]:

- macerace – louhování do jedné dávky kapaliny při normální teplotě,
- digesce – louhování do jedné dávky kapaliny při zvýšené teplotě,
- perkolace – louhování za normální teploty do protékající kapaliny.

Mezi nové techniky získávání fyto látek z rostlinných materiálů patří extrakce pomocí ultrazvuku, extrakce pomocí mikrovln a superkritická fluidní extrakce, které jsou rychlé a efektivní. Všechny tyto způsoby mají mnoho výhod oproti klasickým způsobům extrakce, pokud jde o dobu extrakce, spotřebu rozpouštědla, výtěžky a reprodukovatelnost [17]. Nicméně tyto nové techniky byly testovány pouze v omezené oblasti aplikací. Z průmyslového měřítka a z pohledu výroby musí být vybraná technika extrakce všestranná, jednoduchá, levná a bezpečná jak pro provozní personál, tak i pro spotřebitele.

Obecně se připravený extrakt upraví na žádoucí konzistenci vhodnými metodami, obvykle za sníženého tlaku a za teploty, při které je co nejmenší nebezpečí rozkladu účinných látek. Zbytek vyluhovadla v extraktu nesmí překročit předepsaný limit [2, 7].

2.6.1 Používané extrakční metody pro rostliny Echinacea

Metody extrakce jednotlivých aktivních látek v echinaceji představují široké spektrum možností a kombinací. Mohou se používat různá rozpouštědla (methanol, ethanol s proměnlivým procentem vody), doba extrakce se může pohybovat v rozmezí od 5 minut do 14 dnů macerace, souběžné ošetření pomocí sonikace nebo refluxu a celý proces může být až třikrát opakován. Taková variabilita je důsledkem vývoje analytických strategií, které postupně přesunují svou pozornost z extrakce pouze derivátů kyseliny kávové na postupy, u kterých je možné současně hodnotit jak fenolické látky, tak i alkylamidy [4].

Pro extrakce derivátů kyseliny kávové se nejčastěji využívá extrakce podle Soxhleta s methanolem po dobu jedné hodiny. Pro potravinářské účely je ale methanol nevhodný, z důvodu vysoké toxicity, a proto se využívá ethanol v různých koncentracích (40–80 %). Tsai a spol. [2] zkoumali vliv koncentrace ethanolu (0, 25, 50, 75, 95 %) a jejich výsledky jsou v sestupném pořadí $E_{50} > E_{75} \approx E_{25} > E_0 > E_{95}$. Tito autoři také zkoumali vliv teploty (25 až 95 °C) na extrakci. Při extrakci do 65 °C se výnos aktivních složek v extraktech zvyšoval, ale při teplotě nad 65 °C byl trend opačný.

Yildiz a spol. [42] uvádí, že nejvyšší celkový obsah fenolů (62,58 mg/g) byl dosažen Soxhletovou extrakcí pomocí methanolu, ale tato metoda není vhodná pro potravinářské účely, jak již bylo zmíněno výše. Získaný obsah celkových fenolů pomocí superkritické CO_2 (SCE) a mikrovlnné extrakce (MAE) byly podobné, a sice 22,41 mg/g a 24,42 mg/g. Nejnižší hodnota byla dosažena pomocí subkritické vodní extrakce (SWE) (10,47 mg/g). U SCE zvýšená teplota neměla významnější vliv na celkový obsah fenolů, narozdíl od tlaku a pomocného rozpouštědla. U mikrovlnné extrakce zvýšená teplota a výkon vedly k vyšší výtěžnosti, zatímco doba extrakce neměla žádný vliv.

Další využívaná metoda pro extrakci bioaktivních látek, především pro esenciální oleje z rostlin, je hydrodestilace. Jako rozpouštědlo se používá voda a mechanismus extrakce je podobný jako u Soxhletovy extrakce. Tato extrakce probíhá 3 až 4 hodiny v aparatuře typu Clevenger [4]. Takto získané oleje jsou sušeny nad bezvodým síranem sodným a jsou skladovány v těsně uzavřených tmavých lahvičkách [34].

2.7 Metody pro stanovení hlavních účinných látek

Pro stanovení obsahu účinných látek echinacey je možné použít různé analytické metody. V literatuře se nejčastěji uvádí vysokoúčinná kapalinová chromatografie, ať už samostatně nebo ve spojení s hmotnostní spektrometrií. Také může být využita plynová chromatografie, tenkovrstvá chromatografie nebo kapilární elektroforéza [2, 4, 5, 23, 35, 47–53].

Mezi jednodušší metody využívané k předběžné analýze patří spektrofotometrická metoda pro stanovení celkových fenolických látek pomocí Folin-Ciocalteuova činidla. Pro přípravu kalibrační křivky se využívá kyselina gallová a absorbance vzorku je měřena při 750 nm. Tuto metodu použili např. Erenler a spol. v roce 2015 [43] nebo Lepojevic a spol. v roce 2017 [44].

Další poměrně jednoduchou metodou je kolorimetrický test s chloridem hlinitým pro stanovení celkových flavonoidů. U této metody se využívá katechin jako standard a absorbance vzorku je měřena při 510 nm [44].

U echinaceových extraktů se také často testují antioxidační vlastnosti. Jednou z možností je stanovení antiradikálové aktivity pomocí 2,2-difeny-1-pikrylhydrazylového radikálu (DPPH). Principem této metody je redukce barevného stabilního radikálu DPPH na bezbarvou neutrální látku v přítomnosti antioxidantů s antiradikálovou aktivitou. Pokles absorbance se měří při 517 nm a rozsah odbarvení je úměrný k antioxidační účinnosti extraktu [2, 44].

Další způsob zjištění antioxidační aktivity je metoda TEAC (*Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*). V této metodě se využívá schopnost vzorku zhaset kation-radikál ABTS^{•+}. Zhasení radikálu antioxidanty, které se chovají jako donory vodíku, se sleduje spektrofotometricky při 734 nm [2].

2.7.1 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie v různých obměnách se dá využít ke stanovení většiny aktivních látek echinacey. Mezi tyto látky patří deriváty kyseliny kávové, alkylamidy, polyacetyleny a polyeny a také polysacharidy a glykoproteiny [4].

Deriváty kyseliny kávové z různých druhů třapatkovek byly kvantitativně analyzovány pomocí RP-HPLC od počátku 90. let 20. století, nejčastěji se spektrofotometrickou detekcí při 330 nm. Mohou se však použít i jiné kombinace kapalinové chromatografie, jako je například HPLC s hmotnostním detektorem [43] nebo HPLC s elektrochemickým detektorem.

Pro separaci alkylamidů se zprvu využívala tenkovrstvá chromatografie (TLC), která ovšem nestačila k rozdělení všech alkylamidů ve vzorku. Později se tedy vyvinula pro toto stanovení metoda HPLC a UHPLC. Separace se obvykle provádí pomocí gradientů acetonitril–voda s kolonami C18. Protože echinacea obsahuje mnoho izomerních a strukturně podobných alkylamidů, je užitečné spojit HPLC s detektorem, který poskytuje informace o struktuře.

První chromatografické metody pro analýzu polyacetylenů a polyenů v echinacey byly popsány Bauerem a spol. v roce 1988 [45]. V této studii byly použity TLC a HPLC-UV pro stanovení tzv. otisků prstů extraktů kořenů *E. pallida* a *E. angustifolia*. Z HPLC chromatogramů bylo možné pozorovat, že lipofilní sloučeniny *E. pallida* se zcela liší od sloučenin *E. angustifolia*. Zatímco kořenové extrakty *E. pallida* byly charakterizovány přítomností polyacetylenů a polyenů, *E. angustifolia* z těchto látek neobsahovala ani jednu. Tyto výsledky byly poté potvrzeny v několika dalších pracích prováděných pomocí HPLC-UV. UV spektra jsou velmi užitečná při detekci polyacetylenů a polyenů, protože tyto látky mají typické chromofory, které vykazují charakteristické UV profily [4].

Jako první se zajímali o kvantifikaci polysacharidů a glykoproteinů u druhů echinacea pomocí HPLC Bergeron a Gafner v roce 2007 [46], kteří vyvinuli metodu HPLC s odpařovacím detektorem rozptylu světla (ELSD). Separace byla provedena na koloně BioSep-SEC-S 2000 za použití směsi voda-methanol za gradientové eluce a tato metoda byla také validována. I přes to se ke stanovení složení polysacharidů a glykoproteinů většinou využívá plynová chromatografie nebo vysoce účinná iontoměničová chromatografie [4].

2.7.2 Plynová chromatografie (GC)

Plynová chromatografie je stále nejlepší analytickou technikou pro kvalitativní a semikvalitativní analýzu těkavých látek z trápatky. Ve velké většině studií o těchto látkách je jako detektor upřednostňován hmotnostní spektrometr (MS) kvůli snadnější identifikaci sloučenin eluovaných z kolony [4, 47].

Nyalambasia a spol. [47] zkoumali těkavé látky a jejich biologickou aktivitu z různých druhů echinacey. Jako extrakční metodu použili 4hodinovou hydrodestilaci. Použitý GC-MS systém zahrnoval kapilární kolonu o délce 30 m s průměrem 0,25 mm a tloušťkou filmu 0,25 μm . Jako stacionární fáze byl použit 5% fenylmethylsiloxan a jako nosný plyn bylo použito helium. K eluci sloučenin se výhradně používá teplotní gradient, i v tomto případě se jednalo o zahřátí kolony z původní teploty 70 °C až na konečnou teplotu 250 °C rychlostí 5 °C/min.

Nicméně vzhledem k tomu, že pozornost vědců je zaměřena hlavně na netěkavé sloučeniny z rostlin Echinacea, které se ukázaly být odpovědné za většinu biologických aktivit této rostliny, existuje jen malý zájem o vylepšení analytických metod pro rychlou, účinnou a podrobnou analýzu těkavé složky [4, 35].

2.7.3 Kapilární elektroforéza (CE)

Elektroforetické analytické metody se také využívají ke stanovení fyto látek obsažených v echinaceji, jejich množství ovšem není tak velké jako u chromatografických metod. Nejprve byla vyvinuta micelární elektrokinetická chromatografie (MEKC), která je hybridní technikou mezi elektroforézou a chromatografií. Pomocí této metody je možno stanovit 10 fenolických kyselin, včetně kyseliny cichorové a kyseliny kaftarové, které jsou specifickými markery fyto látek *E. purpurea*. Metoda MEKC zahrnovala použití 70 mol/dm³ deoxycholátu sodného (SDC) ve 40 mol/dm³ borátovém pufru (pH 9,2) a UV detekci při 300 nm. Kyselina žlučová byla použita jako biosurfaktant schopný poskytnout micelární systém s různými a

selektivnějšími vlastnostmi. Tato metoda byla použita pro extrakty z kořenů *E. purpurea* a komerční extrakty a tablety na bázi echinacey [4, 48].

Pro ucelenější přehled o fytolátkách obsažených v echinaceji byla vyvinuta metoda kapilární elektroforézy, která je současně alternativou k většině vyvinutých HPLC metod. V tomto případě [49] byla použita směs SDS/HP-CD (dodecylsírán sodný/2-hydroxypropyl-cyklohextrin) o koncentraci 110 mol/dm³ (SDS) a 100 mol/dm³ (HP-CD) v základním elektrolytu (BGE) sestávajícího z Britton-Robinsonova pufru (pH 8,0; skládá se ze směsi 0,04 mol/l H₃BO₃, 0,04 mol/l H₃PO₄ a 0,04 mol/l CH₃COOH, která byla titrována na požadované pH pomocí 0,2 mol/l NaOH). Za méně než 10 minut bylo dosaženo úplné separace všech hlavních fytochemických markerů, ale tato separace byla silně ovlivněna povahou, koncentrací a pH vzorkovacího pufru.

Nakonec byla vyvinuta metoda kapilární elektroforézy Mančekem a Kreftem v roce 2005 [50], kteří použili 75 mol/dm³ boritan (pH 8,8) jako elektroforetický pufr, nástřik s tlakem 20 mbar po dobu 20 s, separaci při 20 kV a detekci při 350 nm a teplotě 35 °C. Jako vnitřní standard byla použita kyselina gentisová, protože standardy kyseliny cichorové a kaftarové jsou velmi drahé a pro rutinní analýzy nevýhodné.

2.7.4 Infračervená spektroskopie (IR)

Pro možnost rozlišování různých druhů echinacey podle jejich fenolického profilu pro kontrolu kvality jak rostlinného materiálu, tak i konečných produktů může být použita metoda blízké infračervené spektroskopie (NIR). Předností této techniky je především zpracování velkého množství vzorků v relativně krátkém čase [4].

V jednom případě byla použita modifikace infračervené spektroskopie, a sice metoda zeslabeného úplného odrazu (ATR-IR) [51]. V tomto případě se jednalo o rozlišení různých druhů echinacey podle množství echinakosidu v kořenech rostliny. Optimální podmínky a klíčové píky absorpce byly naměřeny ve spektrálním rozsahu od 700 do 1 200 cm⁻¹. Na rozdíl od časově náročné kapalinové chromatografie, výsledky tohoto měření byly detekovány už po 1 minutě analýzy.

Podobně Laasonen a spol. [52] získali velmi přesný identifikační protokol založený na kombinaci blízké infračervené spektroskopie a algoritmu částečných nejmenších čtverců, který umožňuje odhalení falšování minimálně 10 % hmotnosti sušeného materiálu. Spektra byla získána v rozmezí 4 000–10 000 cm⁻¹.

Spektrální i prostorové informace z rostlinného materiálu mohou být získány i pomocí hyperspektrálního zobrazení (HSI). HSI snímky autentických kořenů i nadzemních částí echinacey byly získány Sandasi a spol. [53], kteří pracovali v rozsahu 920–2514 nm. Jejich výsledky ze snímků neobsahují informace týkající se obsahu derivátů kyseliny kávové nebo jiných fytolátek, ale jasně rozlišují mezi podzemními a nadzemními částmi *E. purpurea*, *E. angustifolia* a *E. pallida*. Tyto výsledky byly srovnatelné s výsledky získanými pomocí ultra vysoce účinné kapalinové chromatografie.

2.8 Výroba doplňků stravy z echinacey

2.8.1 Doplňky stravy z echinacey a jejich formy

Doplňky stravy obecně jsou potraviny, které se od běžných potravin odlišují vysokým obsahem vitaminů, minerálních látek nebo jiných látek s nutričním nebo fyziologickým účinkem, a které byly vyrobeny za účelem doplnění běžné stravy spotřebitele. Tyto produkty nejsou určeny k léčbě nebo prevenci onemocnění. Rozdíl mezi doplňkem stravy a léčivým přípravkem je uveden na obalu výrobku. Doplňěk stravy musí být označen „doplňkem stravy“, kdežto léčivý přípravek je označen tzv. registračním číslem. Na rozdíl od doplňků stravy procházejí léčivé přípravky před svým uvedením na trh registračním řízením, v jehož rámci je hodnocena jakost, bezpečnost a účinnost přípravku ve vymezených léčebných či preventivních indikacích. Tento proces je v kompetenci Státního ústavu pro kontrolu léčiv (SÚKL) [54].

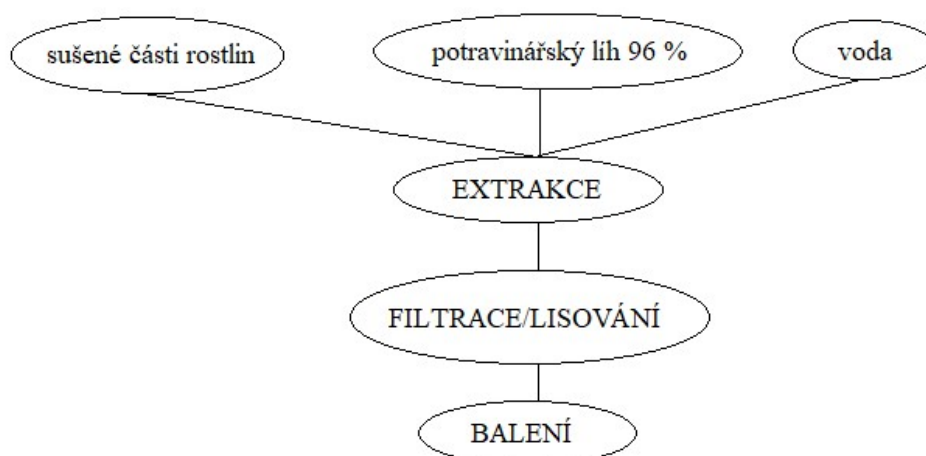
Vyhláška č. 58/2018 Sb. [55] o doplňcích stravy a složení potravin specifikuje požadavky na složení doplňků stravy, jejich označování a způsob použití. V příloze č. 1 této vyhlášky, jsou uvedeny podmínky použití některých rostlin, mezi kterými se nachází i třapatkovka. Nejvyšší přípustné množství v denní dávce je stanoveno na 500 mg a tato hmotnost je vztažena na sušený kořen a nať.

Dále existuje tzv. *on hold* seznam, který obsahuje zdravotní tvrzení, která mohou být uvedena na obalech doplňků stravy. Tento dokument je ale pouze dočasný, jelikož EFSA (Evropský úřad pro bezpečnost potravin) dosud nevydal odborné stanovisko k látkám a jejich vztahu ke zdraví, které tento seznam obsahuje. Doporučuje se tedy při použití tvrzení z tohoto seznamu sledovat vývoj legislativních předpisů. Tento seznam je dostupný na webových stránkách Státního zdravotního ústavu [56]. Pro třapatku úzkolistou jsou v tomto seznamu uvedena tato zdravotní tvrzení:

- Normální funkce močových cest,
- Imunitní systém – antioxidant,
- Normální funkce dýchacího systému a
- Přirozená obranyschopnost – imunitní systém.

Na českém trhu si momentálně můžeme vybrat z celé řady doplňků stravy obsahující echinaceu. První z možností jsou tzv. bylinné kapky, které ve většině případů obsahují extrakt pouze z echinacey, ale objevují se i v kombinaci s další zdraví prospěšnou rostlinou, nejčastěji se zázvorem. Další variantou jsou sirupy, které jsou vhodné i pro děti a těhotné ženy. V tomto případě se nejčastěji jedná o směsi extraktů z různých bylin, případně šťáv z některých plodů. Posledním typem jsou kapsle a tablety. U těchto výrobků se také většinou jedná o směsi s dalšími aktivními složkami, jako jsou například vitamin C, výtažky z rakytníku, šípku nebo zinek.

2.8.2 Technologie výroby echinaceových kapek



Obrázek 14 Schéma výroby bylinných kapek z echinacey

Výroba bylinných kapek začíná u sklizně rostlinného materiálu a jeho zpracování. Jak je uvedeno v kapitole 2.3, nadzemní části echinacey se sklízí v plném květu, poté se nať suší ve vzdušných, resp. tepelných sušárnách při teplotě maximálně do 45 °C. Čerstvá droga obsahuje přibližně 23 % sušiny. Výtěžek při sklizni kořenů je dán stářím a vývojem rostliny. Kořeny se nejprve musí očistit a rozdělit na kousky 5–10 cm dlouhé a poté se suší při maximální teplotě 50 °C [5].

Po usušení je na řadě nejdůležitější krok výroby, a sice extrakce. Pro výrobu tinktur se jako rozpouštědlo využívá 96% potravinářský jemný rafinovaný líh, který se ředí vodou na požadovanou koncentraci. Nejčastěji se používá 40 až 60 %. Nejjednodušší je macerace bylin v tancích do jedné dávky kapaliny při normální teplotě. Echinacea se nejčastěji maceruje po dobu až 3 týdnů. Po ukončení macerace se musí oddělit pevná složka od kapalné pomocí lisování, aby nedocházelo k velkým ztrátám lihu. Výsledný roztok se poté ještě filtruje, aby byly odstraněny i drobné zbytky bylin.

Přečištěný extrakt se stáčí do tmavých lahvíček o různých objemech (od 30 ml do 200 ml) a s různými uzávěry (nejčastěji s kapátkem). Pokud se jedná o lahvičky o objemu 0,06 litru a více a pokud zároveň je obsah ethanolu ve výrobku nejméně 15 %, musí být tyto výrobky označeny kontrolní páskou („kolkem“). Tato povinnost vyplývá ze zákona č. 307/2013 Sb. o povinném značení lihu.

Značení výrobku musí také obsahovat v názvu „doplňek stravy“ a název charakterizujících látek. Dále musí být uveden číselný údaj o množství těchto látek, doporučené denní dávkování a varování před překročením doporučeného denního dávkování. Doporučené dávkování se různí podle výrobce, nejčastěji se uvádí dávkování pro dospělé 10–20 kapek až 3krát denně. Nakonec musí být uvedena řada upozornění, a sice že doplňky stravy nejsou náhradou pestré stravy, aby byly výrobky uloženy mimo dosah dětí a o nevhodnosti výrobku pro děti, těhotné a kojící ženy.

Hotové výrobky se skladují při teplotě mezi 5 a 25 °C a jejich minimální trvanlivost je 48 měsíců.

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použité chemikálie

- Destilovaná voda, FCH VUT, Česká republika
- Ethanol 96%, Penta, Česká republika
- Sorban draselný, ACE Trade spol. s.r.o., Česká republika
- Kyselina gallová, Penta, Česká republika
- Folin-Ciocalteuovo činidlo, Sigma-Aldrich, USA
- Uhličitan sodný bezvodý, Lachema, Česká republika
- ABTS, Sigma-Aldrich, USA
- Peroxosíran draselný, Penta, Česká republika
- Ethanol pro UV-VIS, Sigma-Aldrich, USA
- Trolox, Sigma-Aldrich, USA
- Hélium, čistota 4.8, v tlakové láhvi s redukčním ventilem, SIAD, Česká republika

3.2 Použité přístroje a vybavení

- Běžné laboratorní vybavení
- Analytické váhy AND (citlivost 0,1 mg), A&D Instruments, Company LTD, Japonsko
- UV-VIS spektrofotometr Helios γ, ThermoSpectronic, Velká Británie
- Vodní lázeň Julabo TW 2, Německo
- Vialky o objemu 10 ml s magnetickým uzávěrem
- SPME vlákno DVB/CAR/PDMS 50/30 μm, Supelco, Bellefonte, Pennsylvania, USA
- Plynový chromatograf TraceTM 1310 se split/splitless injektorem, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
- Hmotnostní detektor ISQTM LT Single Quadrupole, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
- Knihovna spekter NIST/EPA/NIH, Verze 2.0, Gaithersburg, Maryland, USA

3.3 Materiál

K výrobě extraktů byly použity sušené části třapatkovky nachové (*Echinacea purpurea*), a sice sušený kořen a květ, viz Obrázek 15. Dodavatelem těchto surovin je Helena Vlčková, Veverská Bítýška, Česká republika.



Obrázek 15 Sušený kořen (vlevo) a květ (vpravo) *E. purpurea*

3.3.1 Komerční vzorky

Pro porovnání reálných vzorků byly použity dva komerční vzorky, a sice:

- Echinaceové bylinné kapky (Obrázek 16), výrobce AROMATICA CZ, s.r.o., Šlapanice. Jedná se o lihový extrakt z echinaceových květů, který obsahuje minimálně 40 % obj. ethanolu. Uvedené dávkování pro dospělé a děti od 10 let: 3x denně 20 kapek (60 kapek $\approx$ 3 ml). Účinky deklarované výrobcem: Třapatka nachová podporuje přirozenou obranyschopnost organismu, slouží jako podpůrná terapie při nachlazení, podporuje normální funkci horních cest dýchacích. Dále má příznivý vliv na normální funkci jater – celkové pročištění organismu.



Obrázek 16 Echinaceové bylinné kapky Aromatica [57]

- Echinacea se zázvorem (Obrázek 17), výrobce AROMATICA CZ, s.r.o., Šlapanice. Jedná se o směs lihových extraktů z echinaceových květů a ze zázvoru lékařského, který obsahuje minimálně 40 % obj. ethanolu. Uvedené dávkování pro dospělé a děti od 10 let: 3x denně 20 kapek (60 kapek $\approx$ 3 ml). Účinky deklarované výrobcem: Třapatka nachová podporuje přirozenou obranyschopnost organismu, slouží jako podpůrná terapie při nachlazení, podporuje normální funkci horních cest dýchacích. Dále má příznivý vliv na normální funkci jater – celkové pročištění organismu. Zázvor lékařský předchází vzniku chronických onemocnění dýchacích cest a podporuje obranyschopnost organismu. Pomáhá rozpouštět hleny a prohřívá organismus. Dále má vliv na normální činnost kardiovaskulárního systému a metabolismus sacharidů.



Obrázek 17 Echinacea se zázvorem Aromatica [58]

3.4 Metody a postup práce

Cílem této diplomové práce je příprava alkoholových extraktů ze sušených květů a kořenů *E. purpurea* ve vhodném extrakčním systému (rozpouštědlo, čas, navážka, teplota) a stanovení obsahu účinných látek.

Jako první byla provedena optimalizace rozpouštědla a času. Pro každou rostlinnou část byla stanovena konkrétní nejlepší koncentrace ethanolu a ta byla použita v dalších krocích optimalizace. Následně byla stanovena optimální navážka sušeného materiálu. Posledním testovaným parametrem byla teplota extrakce. Tyto parametry byly sledovány pomocí stanovení obsahu celkových fenolických látek spektrofotometrickou metodou pomocí Folin-Ciocalteuova činidla.

Po stanovení nejvhodnějšího extrakčního systému byly připraveny 3 nejlepší extrakty, u kterých se zjišťoval obsah celkových fenolických látek, následně byla stanovena antioxidační aktivita, a nakonec byla provedena analýza těkavých látek pomocí HS-SPME-GC-MS. Pro porovnání připravených extraktů byly testovány i dva komerční vzorky.

3.4.1 Optimalizace rozpouštědla a doby extrakce

Pro stanovení vhodného rozpouštědla byly připraveny zásobní roztoky 20%, 40%, 60% a 80% ethanolu zředěním 96% ethanolu. Do kádinek bylo postupně naváženo 5 g rostlinného materiálu. Do takto připravených kádinek bylo poté přidáno 100 ml rozpouštědla, jak je

uvedeno v Tabulce 3. Sušená droga se extrahovala za laboratorní teploty až po dobu 24 hodin. Zároveň byla připravena také druhá sada kádinek pro extrakci po dobu až 53 dní. Z první sady kádinek bylo vždy odebráno 1 ml vzorku postupně v čase 5 a 30 minut a dále po 1, 1,5, 2, 2,5, 4, 6, a 24 hodinách. Z druhé sady kádinek bylo také odebráno vždy 1 ml vzorku, ale vzorky byly odebrány po 1 týdnu a po 53 dnech. V takto odebraných vzorcích byla stanovena celková koncentrace fenolických látek spektrofotometrickou metodou pomocí Folin-Ciocalteuova činidla.

Tabulka 3 Přehled podmínek extrakce pro stanovení optimálního rozpouštědla

navážka rostlinného materiálu	druh a objem rozpouštědla	poměr rostlinného materiálu ku rozpouštědlu
5 g	100 ml vody + 1% sorban draselný	1:20
	100 ml 20% ethanolu	
	100 ml 40% ethanolu	
	100 ml 60% ethanolu	
	100 ml 80% ethanolu	
	100 ml 96% ethanolu	

3.4.2 Optimalizace navážky

Zředěním 96% ethanolu byly připraveny zásobní roztoky ethanolu o koncentracích 20 % a 40 %. 20% roztok ethanolu byl použit pro extrakci z kořenů echinacey a 40% ethanol pro extrakci z květů. Pro stanovení optimální navážky bylo do čtyř kádinek postupně naváženo 5, 10, 15 a 20 g sušené drogy. V Tabulce 4 jsou uvedeny jednotlivé poměry rostlinného materiálu ku rozpouštědlu. Do takto připravených kádinek bylo postupně přidáno 200 ml rozpouštědla a extrakce probíhala při laboratorní teplotě po dobu 30 minut. Po ukončení extrakce byl rostlinný materiál odseparován od roztoku pomocí hrubého sítky. Poté byla stanovena celková koncentrace fenolických látek spektrofotometrickou metodou pomocí Folin-Ciocalteuova činidla.

Tabulka 4 Přehled navážek a jednotlivých použitých poměrů při stanovení optimální navážky

navážka rostlinného materiálu	druh a objem rozpouštědla	poměr rostlinného materiálu ku rozpouštědlu
5 g	200 ml 40% nebo 20% ethanolu	1:40
10 g		1:20
15 g		1:13
20 g		1:10

3.4.3 Optimalizace teploty

Zředěním 96% ethanolu byly připraveny zásobní roztoky ethanolu o koncentracích 20 % a 40 %. 20% roztok ethanolu byl použit pro extrakci z kořenů echinacey a 40% ethanol pro extrakci z květů. Pro stanovení optimální teploty bylo do pěti kádinek postupně naváženo 10 g rostlinného materiálu a poté bylo přidáno 100 ml rozpouštědla. Čtyři kádinky byly umístěny do temperovacího zařízení a extrakce probíhala při 30 °C, 40 °C, 50 °C a 60 °C. V poslední kádince probíhala extrakce za laboratorní teploty. Všech pět extrakcí trvalo 30 minut. Po ukončení extrakce byl rostlinný materiál odseparován od roztoku pomocí hrubého sítko. Poté byla stanovena celková koncentrace fenolických látek spektrofotometrickou metodou pomocí Folin-Ciocalteuova činidla.

3.4.4 Stanovení celkových fenolických látek pomocí Folin-Ciocalteuova činidla

Princip: Redukce činidla obsahujícího fosfomolybdenan a fosfowolframan vedoucí ke změně zabarvení, které se měří spektrofotometricky.

Příprava chemikálií: Folin-Ciocalteuovo činidlo bylo 10krát zředěno tak, že do 100 ml odměrné baňky bylo napipetováno 10 ml činidla a doplněno po rysku destilovanou vodou.

Roztok uhličitanu sodného byl připraven navážením 7,5 g Na₂CO₃, převedením do 100 ml odměrné baňky a doplněním destilovanou vodou po rysku.

Příprava kalibrační křivky: Ze základního standardu kyseliny gallové o koncentraci 1 g/l bylo postupným ředěním připraveno šest roztoků o koncentracích 10, 20, 50, 100, 250 a 500 mg/l. Pro měření kalibrace bylo do zkumavek pipetováno 1 ml Folin-Ciocalteuova činidla, 1 ml destilované vody a 0,1 ml jednotlivých standardů a obsah zkumavek byl důkladně promíchán. Po 5 minutách byly roztoky zalkalizovány přidáním 1 ml roztoku uhličitanu sodného a promíchány. Po 30 minutách byla změřena absorbance při vlnové délce 750 nm.

Vlastní měření: Do zkumavek bylo pipetováno 1 ml Folin-Ciocalteuova činidla, 1 ml vody a 0,1 ml roztoku vzorku a obsah zkumavek byl důkladně promíchán. Po 5 minutách byly roztoky zalkalizovány přidáním 1 ml roztoku uhličitanu sodného a promíchány. Slepý vzorek byl připraven podobným způsobem, jen místo vzorku bylo přidáno 0,1 ml 20%, 40%, 60%, 80%, 96% ethanolu nebo destilované vody v závislosti na rozpouštědle stanovovaného extraktu. Po 30 minutách byla změřena absorbance při vlnové délce 750 nm.

Výpočet:

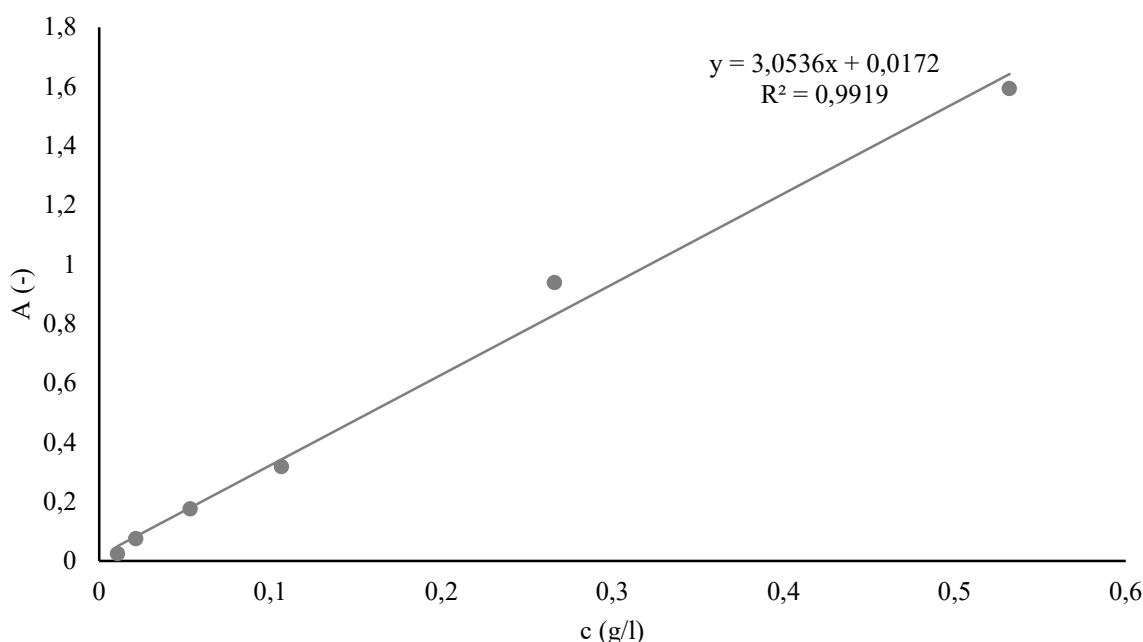
Nejprve byla sestrojena kalibrační závislost absorbance na koncentraci kyseliny gallové, která je uvedena v Grafu 1.

Pomocí funkce LINREGRESE v MS EXCEL byly zjištěny koeficienty regresní přímky a její rovnice je:

$$y = 3,0536x + 0,0172$$

Výpočet obsahu celkových fenolických látek (mg/ml):

$$c = \frac{A - 0,0172}{3,0536}$$



Graf 1 Kalibrační křivka kyseliny gallové

3.4.5 Stanovení antioxidační aktivity

Princip: Metoda spočívá v hodnocení schopnosti vzorku zhasět kation-radikál $\text{ABTS}^{+\bullet}$. Je také označována jako metoda TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity), poněvadž výsledná antiradikálová aktivita vzorku je srovnávána s antiradikálovou aktivitou syntetické standardní látky – derivátu vitamínu E s názvem Trolox (kyselina 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxylová). Zhášení radikálu $\text{ABTS}^{+\bullet}$ antioxidanty, které se chovají jako donory vodíku, se sleduje spektrofotometricky na základě změn absorpčního spektra $\text{ABTS}^{+\bullet}$.

Příprava chemikálií: ABTS bylo rozpuštěno v destilované vodě na koncentraci 7 mmol/dm^3 . Radikálový kationt z ABTS byl získán reakcí s $2,45 \text{ mmol}$ peroxodisíranem draselným. Roztok byl poté ponechán stát ve tmě při pokojové teplotě nejméně po dobu 12 hodin.

Vlastní měření: Před použitím byl zásobní roztok $\text{ABTS}^{+\bullet}$ zředěn ethanolom pro UV/VIS na absorbanci $0,70 \pm 0,02$ při 734 nm (měřeno proti ethanolu pro UV/VIS). Dále byl používán jenom takto naředěný roztok $\text{ABTS}^{+\bullet}$. Do kyvety bylo napipetováno 1 ml zředěného roztoku $\text{ABTS}^{+\bullet}$ a $10 \mu\text{l}$ rozpouštědla (20% nebo 40% ethanol), poté byla ihned změřena absorbance v čase 0 (A_0). Do další kyvety bylo napipetováno 1 ml $\text{ABTS}^{+\bullet}$ a k němu bylo poté přidáno $10 \mu\text{l}$ extraktu vzorku. Vzorek byl promíchán a byl uchován ve tmě. Pokles absorbance byl proměřen v 10. minutě (A_{10}).

Výpočet: Pro výpočet celkové antioxidační aktivity se použije kalibrační křivka Troloxu v rozmezí koncentrací 50–400 µg/ml. Kalibrační závislost je uvedena v Grafu 2.

Pomocí funkce LINREGRESE v MS EXCEL byly zjištěny koeficienty regresní přímky a její rovnice je:

$$y = 0,0014x - 0,0029$$

Výpočet výsledné absorbance:

$$A = A_0 - A_{10}$$

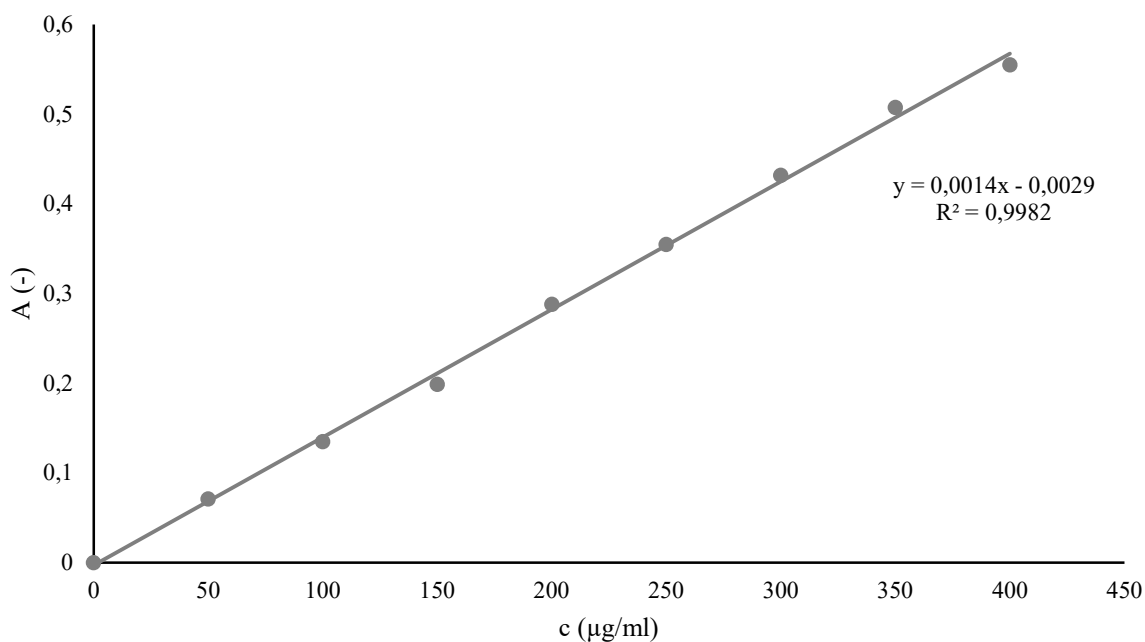
Kde:

A_0 je absorbance v čase 0 min

A_{10} je absorbance v čase 10 min

Výpočet celkové antioxidační aktivity (µg T/ml):

$$c = \frac{A + 0,0029}{0,0014}$$



Graf 2 Kalibrační křivka Troloxu

3.4.6 Stanovení aromatických látek pomocí HS-SPME-GC-MS

Pro stanovení aromatických látek přítomných jak v sušených částech rostliny, tak i v získaných extraktech za ideálních podmínek extrakce, ale i v komerčních vzorcích, byla použita metoda headspace mikroextrakce tuhou fází ve spojení s plynovou chromatografií s hmotnostní detekcí (HS-SPME-GC-MS). Nastavené podmínky byly zcela převzaty z diplomové práce s názvem Ověření metody stanovení alergenních vonných látek v nečokoládových cukrovinkách [59].

3.4.6.1 Příprava vzorků

Na analytických váhách bylo do vialky naváženo přibližně 0,5 g suchého materiálu nebo 3 ml extraktu a vialka byla uzavřena kovovým uzávěrem se vzduchotěsným kaučuk-teflonovým septem. Takto připravené vialky byly následně vloženy do plynového chromatografu a byla spuštěná analýza.

3.4.6.2 Podmínky SPME extrakce

- Doba inkubace 10 minut
- Doba extrakce 20 minut
- Teplota extrakce a inkubace 40 °C
- Agitátor zapnutý 5 sekund, vypnutý 60 sekund
- Množství vzorku 0,5 g nebo 3 ml
- Hloubka ponoření vlákna do vialky 20 mm

3.4.6.3 Podmínky GC-MS analýzy

- Kapilární kolona TG-WaxMS (30 m x 0,25 mm x 0,5 µm)
- Teplota injektoru (desorpce) 240 °C
- Doba desorpce 20 minut
- Dávkování splitless, ventil uzavřený 10 minut
- Hloubka ponoření vlákna do injektoru 40 mm
- Nosný plyn hélium, průtok 1 ml/min
- Teplotní program 40 °C s výdrží 1 min., vzestupný gradient 5 °C/min. do 220 °C s výdrží 22 min., celková doba analýzy 60 min.
- Hmotnostní detektor v módu EI, energie ionizačních elektronů 70 eV, teplota iontového zdroje 200 °C, skenovací rozsah m/z 30-370 amu, rychlost skenování 0,2 s

3.4.6.4 Identifikace a kvantifikace prchavých látek ve vzorcích

Identifikace byla provedena na základě porovnání hmotnostních spekter s dostupnou knihovnou spekter pomocí programu Xcalibur 2.2. Obsah identifikovaných sloučenin je vyjádřený semikvantitativně za použití ploch příslušných píků na chromatogramu a jednotlivé sloučeniny byly rozděleny do skupin podle funkční skupiny látky.

3.5 Statistické zpracování výsledků

Pro každé stanovení byla provedena 3 měření a výsledek je vždy uveden jako průměrná hodnota těchto 3 měření. V programu MS EXCEL byla vypočítána směrodatná odchylka pomocí funkce SMODCH.VÝBĚR.S. Tato hodnota spolu s průměrnou hodnotou je uvedena ve výsledcích. Hodnota nejistoty měření byla také pro názornost vynesena do sloupcových diagramů v podobě chybových úseček.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Optimalizace rozpouštědla a doby extrakce

Pro výběr optimálního rozpouštědla bylo testováno celkem šest různých rozpouštědel, a sice směs ethanolu a vody o koncentracích 20 %, 40 %, 60 %, 80 % a 96 % a také pouze voda, která byla konzervována 1% sorbanem draselným. Zároveň byla testována doba extrakce od 5 minut do 53 dní. Takto velký časový interval byl testován z důvodu možnosti zkrácení výroby, která v průmyslu trvá přibližně 3 týdny.

Výsledky pro extrakty ze sušených květů třapatky jsou uvedeny v Tabulce 5 a Grafu 3. Pro ilustraci je zde také uveden Obrázek 18, který zobrazuje výsledné roztoky po 24 hodinách.



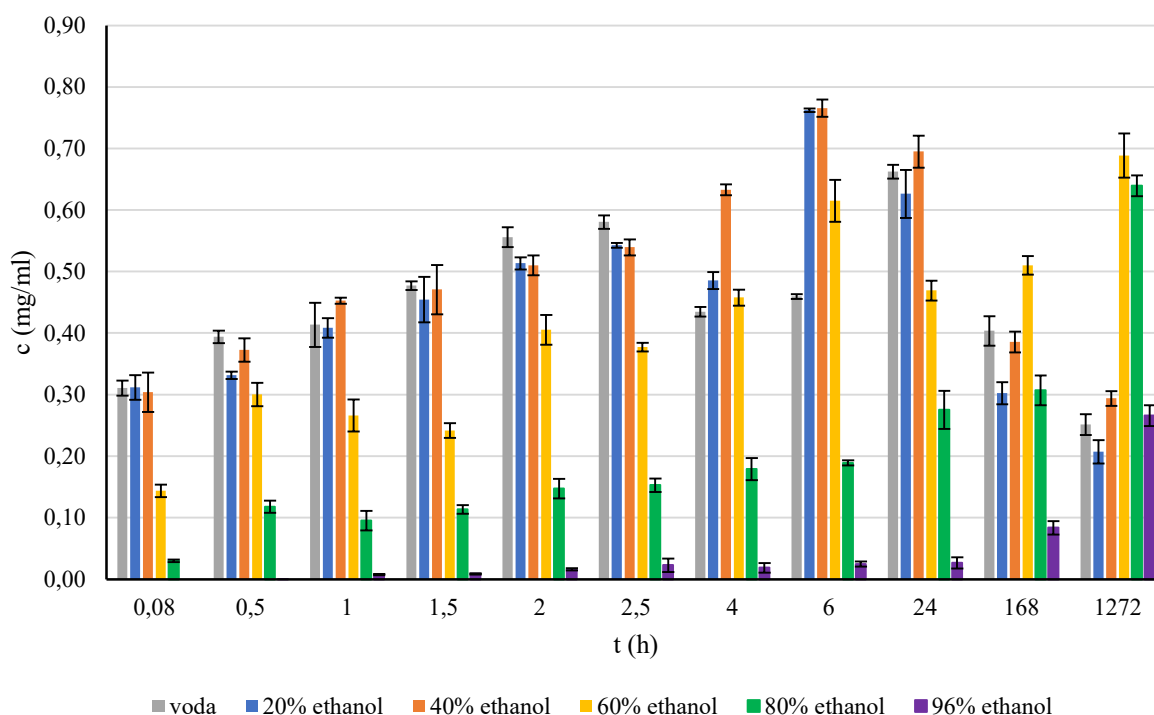
Obrázek 18 Extrakty ze sušeného květu *E. purpurea* po 24 hodinách macerace, zleva narůstá koncentrace ethanolu (0, 20, 40, 60, 80 a 96 %)

Tabulka 5 Celková koncentrace fenolických látek (mg/ml) jednotlivých odběrů extraktu z květu *E. purpurea* v různých rozpouštědlech

doba extrakce	voda	20% ethanol	40% ethanol
5 minut	0,311 ± 0,012	0,312 ± 0,020	0,304 ± 0,032
30 minut	0,394 ± 0,010	0,332 ± 0,006	0,373 ± 0,019
1 hodina	0,414 ± 0,036	0,409 ± 0,016	0,453 ± 0,005
1,5 hodiny	0,477 ± 0,007	0,454 ± 0,037	0,471 ± 0,040
2 hodiny	0,556 ± 0,016	0,513 ± 0,010	0,510 ± 0,016
2,5 hodiny	0,581 ± 0,011	0,543 ± 0,004	0,540 ± 0,013
4 hodiny	0,435 ± 0,008	0,486 ± 0,014	0,633 ± 0,009
6 hodin	0,459 ± 0,004	0,762 ± 0,003	0,766 ± 0,014
24 hodin	0,662 ± 0,011	0,626 ± 0,039	0,695 ± 0,026
7 dní	0,404 ± 0,024	0,302 ± 0,018	0,386 ± 0,017
53 dní	0,251 ± 0,017	0,207 ± 0,019	0,294 ± 0,012

Tabulka 5 pokračování, Celková koncentrace fenolických látek (mg/ml) jednotlivých odběrů **extraktu** z květu *E. purpurea* v různých rozpouštědlech

doba extrakce	60% ethanol	80% ethanol	96% ethanol
5 minut	0,144 ± 0,010	0,030 ± 0,002	0
30 minut	0,301 ± 0,019	0,118 ± 0,010	0
1 hodina	0,266 ± 0,026	0,095 ± 0,016	0,007 ± 0,001
1,5 hodiny	0,242 ± 0,012	0,114 ± 0,007	0,009 ± 0,001
2 hodiny	0,405 ± 0,024	0,147 ± 0,016	0,016 ± 0,002
2,5 hodiny	0,378 ± 0,007	0,153 ± 0,011	0,023 ± 0,011
4 hodiny	0,458 ± 0,013	0,179 ± 0,018	0,019 ± 0,008
6 hodin	0,615 ± 0,034	0,189 ± 0,004	0,025 ± 0,004
24 hodin	0,469 ± 0,016	0,275 ± 0,031	0,027 ± 0,009
7 dní	0,510 ± 0,015	0,307 ± 0,024	0,084 ± 0,011
53 dní	0,689 ± 0,036	0,639 ± 0,017	0,266 ± 0,017



Graf 3 Celková koncentrace fenolických látek v závislosti na čase a rozpouštědle v **extraktech** z květů *E. purpurea*

96% ethanol není vhodné rozpouštědlo jak z ekonomického, tak i z časového hlediska. I po týdnů macerace (168 hodin) celková koncentrace polyfenolů v tomto rozpouštědle dosahuje pod úroveň 0,10 mg/ml. V porovnání s nejvyšší naměřenou hodnotou ($0,766 \pm 0,014$ mg/ml) je rozdíl více než 9násobný. Nejvyšší hodnota pro toto rozpouštědlo byla naměřena při

1 272 hodinách (53 dnů), a sice $0,266 \pm 0,017$ mg/ml, ale i tato hodnota je téměř 3krát menší než nejvyšší naměřená hodnota.

Podobně je na tom i ethanol o koncentraci 80 %. Postupně se koncentrace polyfenolů zvyšuje až po hodnotu $0,639 \pm 0,017$ mg/ml při 1 272hodinové extrakci, ale i tato macerace není časově ani ekonomicky výhodná.

Nejvyšší koncentrace polyfenolů pro ethanol o koncentraci 60 % byla naměřena v čase 1 272 hodin, což opět není příliš vhodné. Rozdíl mezi touto hodnotou a nejvyšší naměřenou hodnotou je 0,077 mg/ml.

Nejvyšší naměřená hodnota, která odpovídá koncentraci $0,766 \pm 0,014$ mg celkových fenolů na 1 ml extraktu byla naměřena pro 40% ethanol v čase 6 hodin. I v čase 24 hodin koncentrace polyfenolů je nejvyšší právě pro 40% ethanol. Proto toto rozpouštědlo bylo vyhodnoceno jako nejvhodnější extrahovadlo pro echinaceové květy.

20% ethanol také dosahuje nejvyšší hodnoty po 6 hodinách extrakce, rozdíl v koncentracích polyfenolů v tomto čase mezi 20% a 40% ethanolem je pouze 0,004 mg/ml, ale v čase 24 hodin je rozdíl větší, a sice 0,069 mg/ml. Také je větší rozdíl v koncentracích po 6 a 24 hodinách, a proto toto rozpouštědlo nebylo vybráno jako to nejvhodnější.

Voda se zpočátku může jevit jako výhodná jak z ekonomického, tak i časového hlediska, avšak po 2,5 hodinách došlo nejprve k poklesu, poté vzrůstu, a nakonec zase k poklesu vyextrahovaných látek. Voda není vhodná jako rozpouštědlo, protože je mikrobiologicky riziková, a proto musel být přidán konzervant, a sice 1% sorban draselný. Podle nařízení Komise (EU) 2018/98 ze dne 22. ledna 2018, v kategorii 17.2 (Doplňky stravy dodávané v tekuté podobě) mohou být kyselina sorbová a sorbany použity v maximální koncentraci 2 000 mg/l, resp. mg/kg [60].

Při optimalizaci doby extrakce bylo zjištěno, že nejvyšší koncentrace fenolických látek byla naměřena v čase 6 hodin, jak pro optimální rozpouštědlo (40% ethanol), tak i pro 20% ethanol. S prodlužující se dobou extrakce pro tato dvě rozpouštědla dochází k poklesu fenolických látek. K nárůstu dochází pouze u 80% a 96% ethanolu, ale jak už bylo uvedeno výše, tato dvě rozpouštědla nejsou vhodná z ekonomického hlediska.



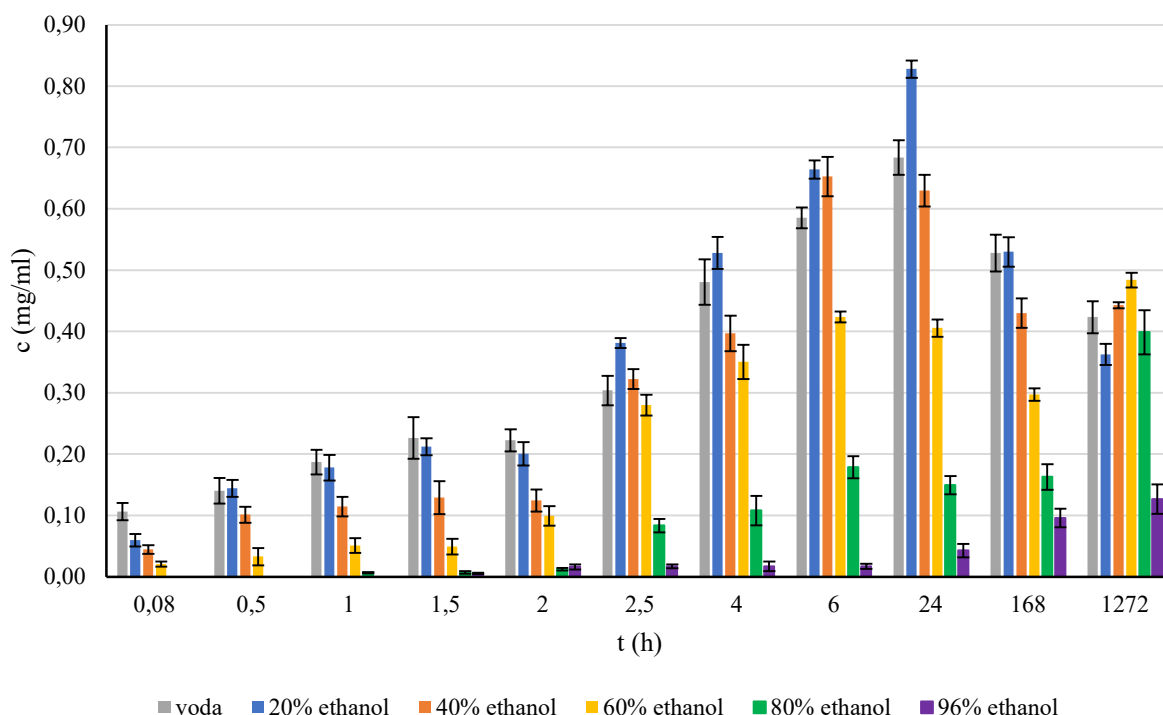
Obrázek 19 Extrakty ze sušeného kořene *E. purpurea* po 24 hodinách macerace, zleva narůstá koncentrace ethanolu (0, 20, 40, 60, 80 a 96 %)

Výsledky pro extrakty ze sušeného kořene třapatky jsou uvedeny v Tabulce 6 a Grafu 4. Pro ilustraci je zde také uveden Obrázek 19, který zobrazuje výsledné roztoky po 24 hodinách extrakce.

Tabulka 6 Celková koncentrace fenolických látek (mg/ml) v jednotlivých odběrech extraktu z kořene E. purpurea v různých rozpouštědlech

doba extrakce	voda	20% ethanol	40% ethanol
5 minut	0,106 ± 0,014	0,060 ± 0,010	0,044 ± 0,007
30 minut	0,140 ± 0,021	0,144 ± 0,014	0,101 ± 0,013
1 hodina	0,187 ± 0,020	0,178 ± 0,021	0,115 ± 0,016
1,5 hodin	0,227 ± 0,034	0,212 ± 0,014	0,129 ± 0,027
2 hodiny	0,223 ± 0,018	0,201 ± 0,019	0,125 ± 0,018
2,5 hodin	0,304 ± 0,024	0,381 ± 0,008	0,322 ± 0,016
4 hodiny	0,481 ± 0,037	0,528 ± 0,026	0,397 ± 0,029
6 hodin	0,585 ± 0,017	0,664 ± 0,015	0,653 ± 0,032
24 hodin	0,684 ± 0,028	0,828 ± 0,014	0,630 ± 0,026
7 dní	0,528 ± 0,030	0,530 ± 0,024	0,430 ± 0,024
53 dnů	0,423 ± 0,026	0,363 ± 0,017	0,443 ± 0,005

doba extrakce	60% ethanol	80% ethanol	96% ethanol
5 minut	0,021 ± 0,004	0	0
30 minut	0,033 ± 0,014	0	0
1 hodina	0,051 ± 0,012	0,007 ± 0,001	0
1,5 hodin	0,049 ± 0,013	0,007 ± 0,002	0,006 ± 0,001
2 hodiny	0,099 ± 0,016	0,013 ± 0,002	0,016 ± 0,004
2,5 hodin	0,280 ± 0,017	0,084 ± 0,011	0,017 ± 0,003
4 hodiny	0,351 ± 0,028	0,108 ± 0,024	0,017 ± 0,008
6 hodin	0,424 ± 0,009	0,179 ± 0,018	0,017 ± 0,004
24 hodin	0,406 ± 0,014	0,150 ± 0,015	0,043 ± 0,011
7 dní	0,297 ± 0,010	0,163 ± 0,021	0,096 ± 0,015
53 dnů	0,484 ± 0,012	0,399 ± 0,036	0,127 ± 0,024



Graf 4 Celková koncentrace fenolických látek v závislosti na čase extrakce a rozpouštědle v **extraktech** z kořenů *E. purpurea*

Pro extrakty z echinaceových kořenů platí obdobné trendy jak pro 96%, tak i pro 80% ethanol jako u extraktů z echinaceových květů. S delší dobou macerace dochází k nárůstu celkových vyextrahovaných polyfenolů, ale hodnoty v posledním odběru jsou 2krát (pro 80% ethanol) až 6krát (pro 96% ethanol) nižší než nejvyšší naměřená hodnota (0,828 mg/ml), a proto tato dvě rozpouštědla nebyla zvolena jako vhodná.

Nejvyšší hodnota v čase 53 dní byla naměřena i pro ethanol o koncentraci 60 %. Tato hodnota je ale o 0,344 mg/ml nižší než nejvyšší naměřená hodnota. Opět se tedy jedná o časově i ekonomicky náročnější proces.

Extrakty 40% ethanolu dosahují svého maxima po 6 hodinách macerace, stejně jako tomu bylo u extraktů z květů. V tomto případě se ale nejedná o nejvyšší naměřenou hodnotu, a proto ani toto rozpouštědlo nebylo stanoveno jako to nejvhodnější.

U 20% ethanolu bylo změřeno, že se jedná o nejvýnosnější rozpouštědlo hned u šesti různých časů. Nejprve v čase 30 minut a poté v odběrech od 2,5 až do 168 hodin. Z tohoto důvodu bylo toto rozpouštědlo stanoveno jako nejvhodnější extrahovadlo pro kořeny třapatky.

U vody jako rozpouštědla se projevuje stejný trend jako v extraktech z květů. Od začátku macerace dochází k nárůstu vyextrahovaných látek, ale po 24 hodinách dochází k poklesu. I v tomto případě musel být použit konzervant proti nárůstu mikroorganismů.

Při optimalizaci doby extrakce bylo zjištěno, že nejvyšší koncentrace polyfenolů byla naměřena v čase 24 hodin, jak pro optimální rozpouštědlo (20% ethanol), tak i pro vodu. Rozdíl mezi nejvyššími hodnotami v čase 24 a 168 hodin je téměř 0,3 mg/ml. Proto macerace po dobu 24 hodin se jeví jako nejvhodnější.

Při porovnání extraktů z květů a z kořene bylo zjištěno, že na začátku macerace byl výtěžek fenolů z květů až 3krát větší než výtěžek z kořenů. S postupem času se rozdíl snižuje až do času

6 hodin, kdy v extraktech z květů dochází k naměřenému maximu. Toto maximum dosahuje hodnoty 0,766 mg/ml. Nejvyšší naměřená hodnota z extraktů z kořene byla naměřena při následujícím odběru v čase 24 hodin. Toto maximum dosahuje hodnoty 0,828 mg/ml. Rozdíl mezi těmito maximy je 0,062 mg/ml. Z tohoto vyplývá, že extrakty z kořenů mohou být v praxi využívány ve stejném rozsahu jako ty z květů. Extrakty z květů sice zaberou méně času, ale je potřeba více ethanolu. U extraktů z kořene je tomu naopak, macerace vyžadují nižší koncentraci ethanolu, ale je zapotřebí více času.

Wu a spol. [61] zkoumali různá rozpouštědla (voda, methanol a ethanol) pro efektivní extrakci derivátů kyseliny kávové a uvádí jako nejlepší rozpouštědlo pro kořeny *E. purpurea* 60% ethanol. Jejich experiment byl prováděn za zvýšené teploty 60 °C po dobu 2 hodin. Také uvádí, že při koncentracích ethanolu nad 60 % může docházet ke koagulaci proteinů, což by způsobilo vyšší difúzní odpor. Výsledky této studie jsou odlišné od výsledků získaných v této práci. Rozdíl mezi nimi může být připisán zcela odlišným teplotám extrakce.

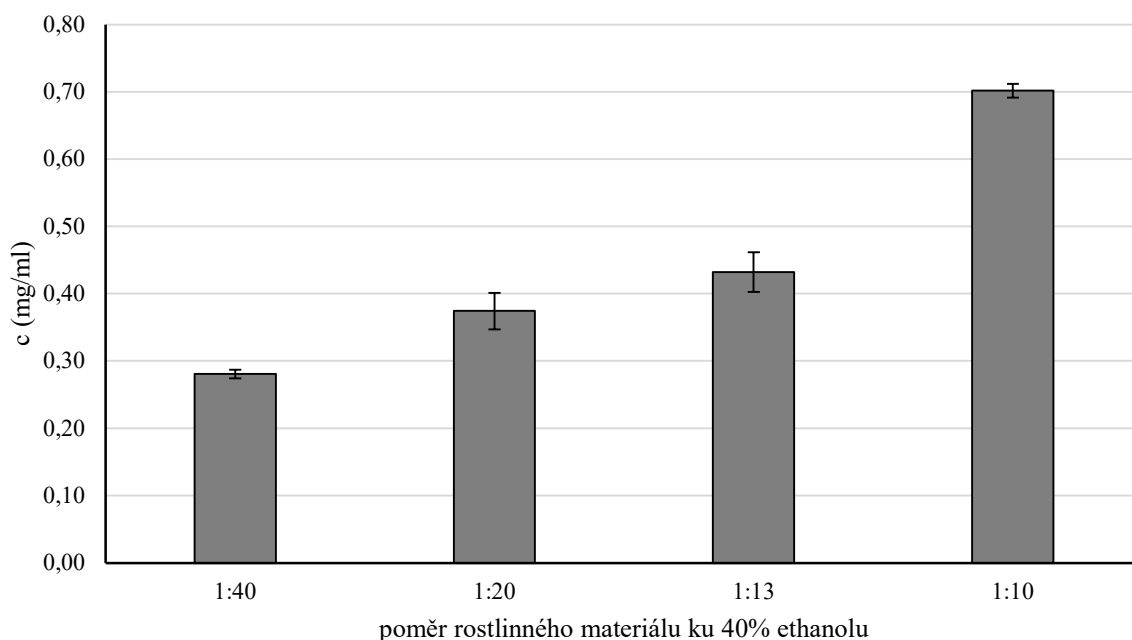
Tsai a spol. [2] také zkoumali extrakce květů *E. purpurea* pro různé koncentrace ethanolu (25, 50, 75 a 95 %). Nejvyšší obsah celkových polyfenolů naměřili u extraktu s 50% ethanol. Pro extrakce použili mletý květový prášek, který byl macerován 30 minut na třepače. Také uvádí, že výtěžnost extrakce dosahuje 34,3 %. U této práce byly také použity zcela odlišné podmínky, ať už se jedná o rostlinný materiál nebo o vliv míchání. I přesto můžeme sledovat podobný trend nárůstu a následného poklesu vyextrahovaných látek v této diplomové práci.

4.2 Optimalizace navážky

Vhodný poměr rostlinného materiálu ku rozpouštědlu byl prověřen pro optimální rozpouštědla z předchozí analýzy, a sice 40% ethanol pro květy a 20% ethanol pro kořeny. Doba macerace byla 30 minut. Celkem byly prověřeny čtyři navážky, a sice v poměru 1:40, 1:20, 1:13 a 1:10. Výsledky koncentrací celkových fenolických látek v jednotlivých extraktech z echinaceových květů jsou uvedeny v Tabulce 7 a v Grafu 5.

Tabulka 7 Celková koncentrace fenolických látek (mg/ml) v jednotlivých poměrech extraktu z květů *E. purpurea*

navážka (g)	poměr rostlinného materiálu ku rozpouštědlu	koncentrace (mg/ml)	SD
5	1:40	0,281	0,006
10	1:20	0,374	0,027
15	1:13	0,432	0,029
20	1:10	0,702	0,010



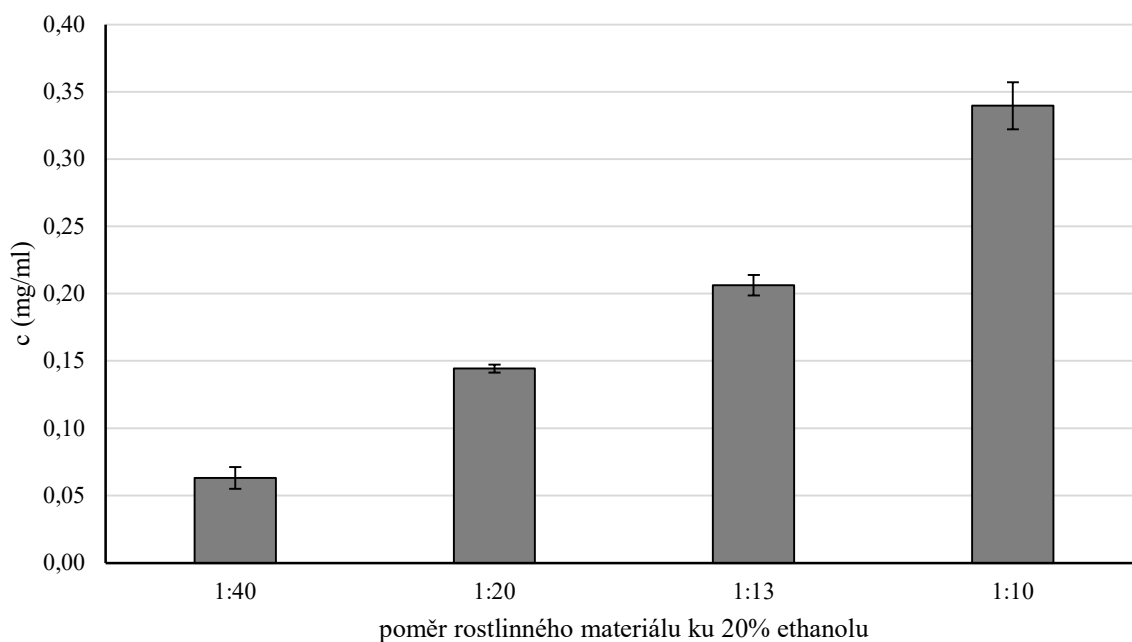
*Graf 5 Celková koncentrace fenolických látek v závislosti na poměru navážky a rozpouštědla pro extrakty z květů *E. purpurea**

Z tohoto grafu vyplývá, že nejvýnosnější je extrakce v poměru 1:10. V tomto poměru byla stanovena hodnota celkových fenolických látek na $0,702 \pm 0,010$ mg/ml. Zároveň u tohoto poměru se vyskytly problémy s ponořením celé navážky sušeného květu do rozpouštědla z důvodu velkého objemu. V laboratorním měřítku se jedná o drobnost, ale v praxi toto může představovat větší problém. I přes to byl tento poměr vyhodnocen jako nejvýhodnější a byl použit v dalším experimentu.

Výsledky koncentrací celkových fenolických látek v jednotlivých extraktech z kořenů echinacey jsou uvedeny v Tabulce 8 a v Grafu 6. U těchto extraktů byl také stanoven poměr 1:10 jako nejvhodnější, hodnota celkových fenolických látek byla stanovena na $0,340 \pm 0,017$ mg/ml. Výnosnost extraktů z kořene je ovšem přibližně dvakrát menší než z květů. Tento rozdíl byl pravděpodobně způsoben krátkou dobou macerace (pouze 30 minut). Literární údaje o vlivu množství navážky rostlinného materiálu na extrakci bioaktivních látek z echinacey nejsou dostupné.

*Tabulka 8 Celková koncentrace fenolických látek (mg/ml) v jednotlivých poměrech extraktu z kořene *E. purpurea**

poměr rostlinného materiálu ku rozpouštědlu	navážka (g)	koncentrace (mg/ml)	SD
1:40	5	0,063	0,008
1:20	10	0,144	0,003
1:13	15	0,206	0,008
1:10	20	0,340	0,017



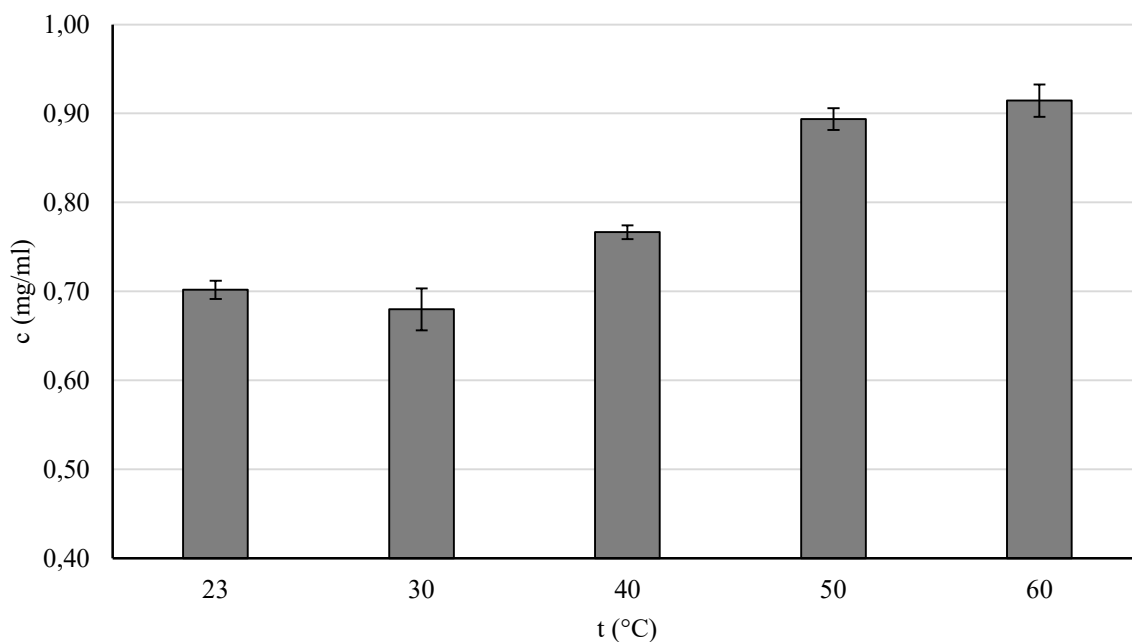
Graf 6 Celková koncentrace fenolických látek v závislosti na poměru navážky a rozpouštědla pro extrakty z kořene *E. purpurea*

4.3 Optimalizace teploty

Při optimalizaci teploty extrakce byly použity ideální podmínky z předchozí analýzy, a sice 40% ethanol pro květy, 20% ethanol pro kořen a poměr navážky ku rozpouštědlu 1:10. Doba macerace byla 30 minut. Celkem bylo prověřeno pět teplot, a sice laboratorní teplota (= 23 °C) a dále zvýšená teplota (30 °C, 40 °C, 50 °C a 60 °C). Výsledky koncentrací celkových fenolických látek v jednotlivých extraktech z echinaceových květů jsou uvedeny v Tabulce 9 a v Grafu 7.

Tabulka 9 Celková koncentrace fenolických látek (mg/ml) v **extraktech z květů** *E. purpurea* při různých teplotách

teplota (°C)	koncentrace (mg/ml)	SD
23	0,702	0,010
30	0,680	0,024
40	0,767	0,008
50	0,894	0,012
60	0,915	0,018



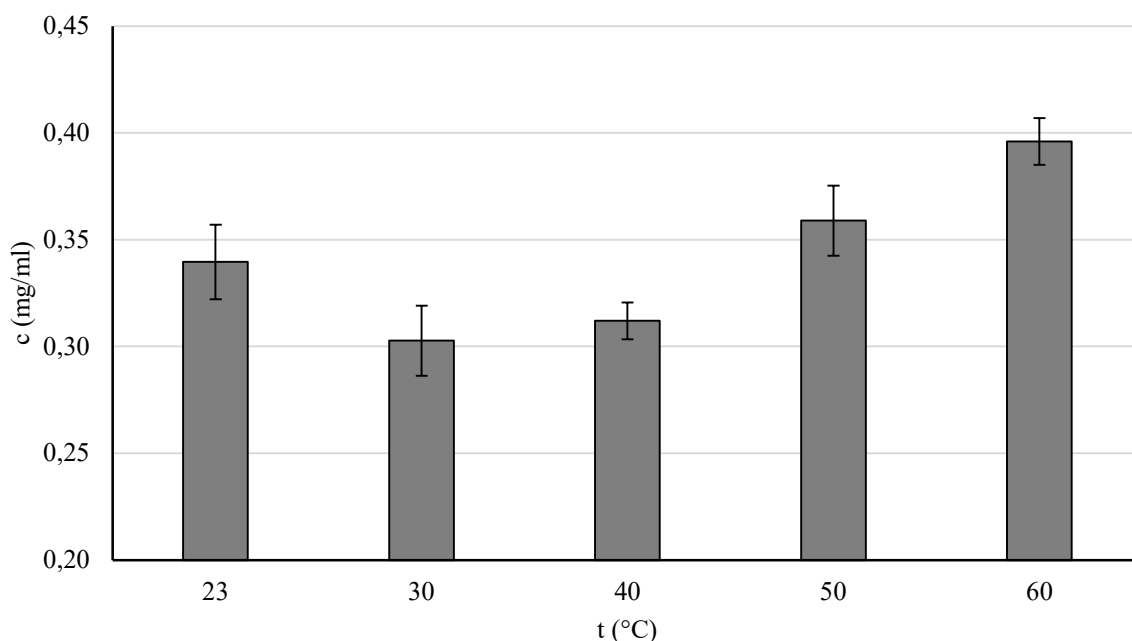
Graf 7 Celková koncentrace fenolických látek v závislosti na teplotě pro **extrakty z květů** *E. purpurea*

Při laboratorní teplotě byl stanoven celkový obsah fenolických látek na $0,702 \pm 0,010$ mg/ml. Tato hodnota se statisticky významně neliší od hodnoty naměřené při teplotě 30 °C. S vyšší teplotou dochází k nárůstu vyextrahovaných látek. Při teplotách 50 °C a 60 °C byly naměřeny opět statisticky se nelišící hodnoty. Z tohoto důvodu by jako optimální teplota pro extrakty z květů byla stanovena teplota 50 °C. Z ekonomického hlediska po připočítání provozních nákladů temperovacího zařízení by vyšší výtěžek fenolických látek nepokryl náklady na výrobu, proto jako optimální teplota byla vyhodnocena laboratorní teplota.

Výsledky koncentrací celkových fenolických látek v jednotlivých extraktech z echinaceových kořenů jsou uvedeny v Tabulce 10 a v Grafu 8. V tomto případě docházelo ke kolísání koncentrace fenolů. Nejvyšší hodnota byla naměřena při teplotě 60 °C, a sice $0,396 \pm 0,011$ mg/ml. Rozdíl mezi touto hodnotou a hodnotou naměřenou při laboratorní teplotě je pouze 0,056 mg/ml. Proto i v tomto případě jako optimální teplota pro extrakty z kořenů třapatky byla zvolena laboratorní teplota z ekonomických důvodů.

Tabulka 10 Celková koncentrace fenolických látek (mg/ml) v **extraktech z kořene** *E. purpurea* při různých teplotách

teplota (°C)	koncentrace (mg/ml)	SD
23	0,340	0,017
30	0,303	0,016
40	0,312	0,009
50	0,359	0,016
60	0,396	0,011



Graf 8 Celková koncentrace fenolických látek v závislosti na teplotě pro **extrakty z kořene** *E. purpurea*

Při porovnání koncentrací obsahových látek získaných z květů a z kořenů bylo zjištěno, že extrakty z květů obsahují více než 2krát více fenolických látek než extrakty z kořenů. Tento rozdíl byl pravděpodobně opět způsoben krátkou dobou macerace.

Wu a spol. [58] zkoumali také vliv teploty (40, 60 a 80 °C) na extrakci bioaktivních látek z *E. purpurea*. Po dvou hodinové extrakci v 60% ethanolu získali nejvyšší obsah celkových polyfenolů při teplotě 60 °C. Rozdíly mezi touto teplotou a dalšími dvěma jsou ovšem minimální. I přes to doporučují teplotu 60 °C jako nejvýhodnější. Stejného výsledku bylo dosaženo i v našem experimentu, ale jak už je uvedeno výše, provozní náklady na zvýšení teploty při výrobě echinaceových extraktů jsou příliš vysoké, a proto jako optimální teplota pro extrakty z třapatky byla zvolena laboratorní teplota.

4.4 Stanovení celkových fenolických látek ve vybraných vzorcích

S ohledem na největší celkovou koncentraci fenolických látek a na ekonomickou stránku výroby byly vyhodnoceny jako nejlepší podmínky extrakce pro květy *E. purpurea*:

- rozpouštědlo 40% ethanol,
- doba 6 hodin,
- poměr rostlinného materiálu ku rozpouštědlu 1:10,
- laboratorní teplota.

Zároveň byl připraven i druhý extrakt z květů, kde byly použity stejné podmínky extrakce, avšak jako rozpouštědlo byl použit 20% ethanol. Největší rozdíl mezi použitými podmínkami v tomto experimentu a podmínkami používanými v průmyslové výrobě je doba macerace. Jak je uvedeno v kapitole 2.8.2, v průmyslu se třapatka maceruje až po dobu 3 týdnů. Toto zkrácení

doby extrakce by mohlo být velkým přínosem pro zrychlení výroby echinaceových kapek a s tím spojený ekonomický zisk.

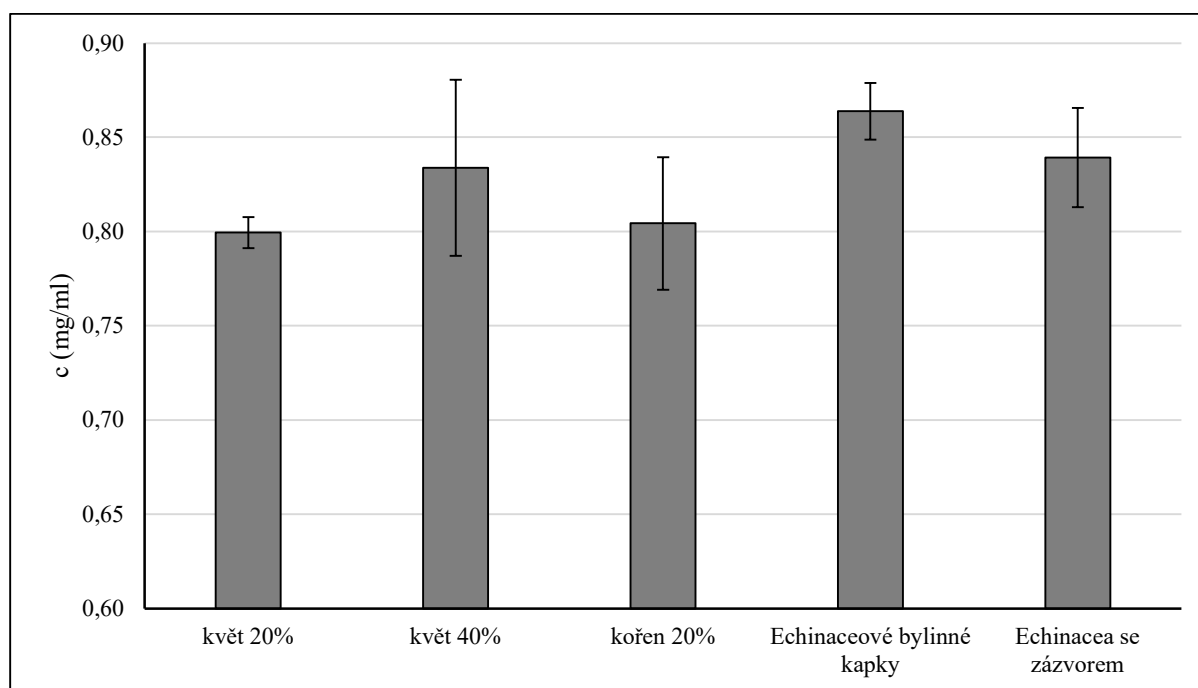
Stejným způsobem byly vyhodnoceny i optimální podmínky pro extrakt z kořenů *E. purpurea*, a sice:

- rozpouštědlo 20% ethanol,
- doba 24 hodin,
- poměr rostlinného materiálu ku rozpouštědlu 1:10,
- laboratorní teplota.

Pro porovnání připravených extraktů byly stanoveny koncentrace celkových fenolických látek ve dvou komerčních vzorcích, a sice Echinaceových bylinných kapkách, AROMATICA CZ (viz kapitola 3.3.1, Obrázek 16) a tekutém přípravku Echinacea se zázvorem, AROMATICA CZ (viz kapitola 3.3.1, Obrázek 17). Jedná se o lihové extrakty z echinaceových květů, které obsahují minimálně 40 % obj. ethanolu. Vzorky nebyly nijak upravovány a rovnou byla stanovena koncentrace celkových fenolů pomocí Folin-Ciocalteuova činidla. Výsledky jsou uvedeny v Tabulce 11 a v Grafu 9.

Tabulka 11 Celková koncentrace fenolických látek (mg/ml) ve vybraných vzorcích

název vzorku	koncentrace (mg/ml)	SD
20% extrakt z květu	0,799	0,008
40% extrakt z květu	0,834	0,047
20% extrakt z kořene	0,804	0,035
Echinaceové bylinné kapky	0,864	0,015
Echinacea se zázvorem	0,839	0,026



Graf 9 Celková koncentrace fenolických látek ve vybraných extraktech

Všechny námi připravené extrakty dosahují srovnatelného obsahu celkových fenolických látek. Při porovnání 40% extraktu z květů s komerčními vzorky jsou dosažené výsledky také statisticky totožné. V Echinaceových bylinných kapkách byla naměřena koncentrace fenolických látek $0,864 \pm 0,015$ mg/ml a v Echinaceji se zázvorem $0,839 \pm 0,026$ mg/ml. Rozdíl mezi komerčními a námi získanými extrakty spočívá především v době macerace. Jak už je popsáno dříve v této kapitole, komerční vzorky byly macerovány 3 týdny a naše získané extrakty pouze 6 nebo 24 hodin. Rozdíl může být i v poměru bylinného materiálu a rozpouštědla, ovšem tento údaj je pro nás neznámý.

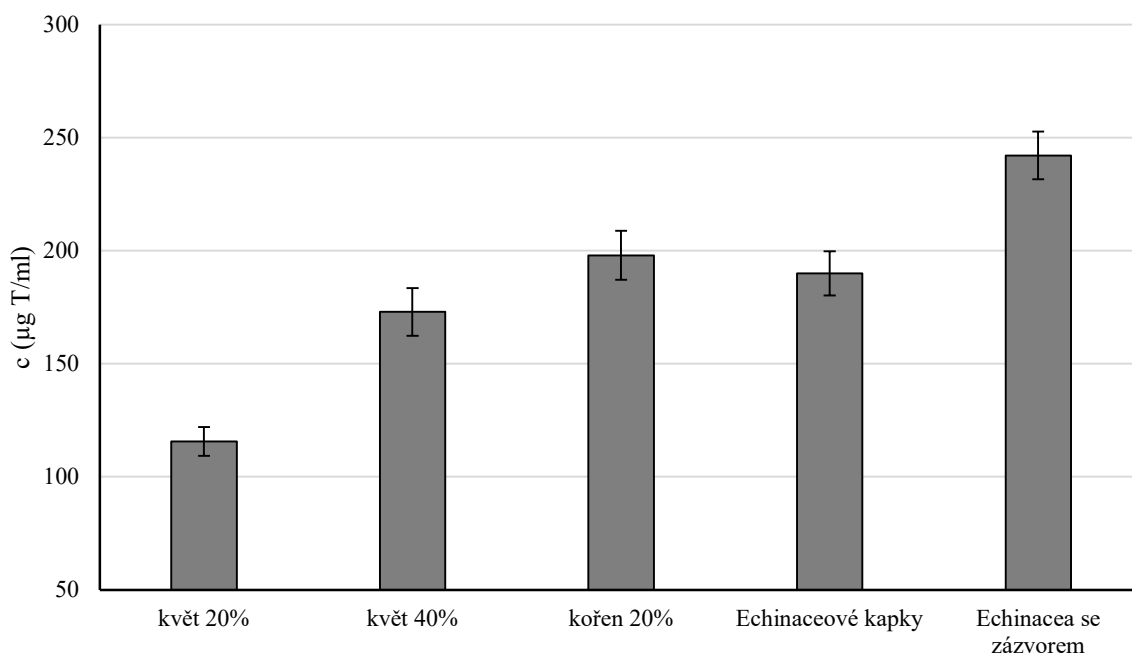
4.5 Stanovení antioxidační aktivity ve vybraných vzorcích

Stejně jako v předchozím kroku experimentu i pro stanovení antioxidační aktivity byly použity tři nejlepší získané extrakty a dva komerční vzorky. Vzorky nebyly nijak upravovány a rovnou byla stanovena antioxidační aktivita pomocí kation-radikálu ABTS⁺⁺. Výsledky jsou uvedeny v Tabulce 12 a v Grafu 10. Vypočítaná koncentrace je vztažena na μg troloxu v ml vzorku ($\mu\text{g T/ml}$).

Tabulka 6 Celková antioxidační aktivita vybraných extraktů vyjádřena v μg troloxu v ml vzorku

název vzorku	koncentrace ($\mu\text{g T/ml}$)	SD
20% extrakt z květu	116	6
40% extrakt z květu	173	11
20% extrakt z kořene	198	11
Echinaceové bylinné kapky	190	10
Echinacea se zázvorem	242	11

Z námi připravených extraktů vykazuje nejvyšší antioxidační aktivitu extrakt z kořene, a sice 198 ± 11 $\mu\text{g T/ml}$. Nejnižší aktivita byla naměřena v 20% extraktu z květu. Komerční Echinaceové kapky dosahují aktivity 190 ± 10 $\mu\text{g T/ml}$, tato hodnota se statisticky neliší od naměřených hodnot 40% extraktu z květu (173 ± 11 $\mu\text{g T/ml}$) a 20% extraktu z kořene (198 ± 11 $\mu\text{g T/ml}$). V druhém komerčním vzorku byla stanovena antioxidační aktivita na 242 ± 11 $\mu\text{g T/ml}$. Rozdíl mezi oběma komerčními vzorky je pravděpodobně způsoben složením vzorků, konkrétně zázvorový extrakt má také antioxidační vlastnosti, a proto zvyšuje tuto aktivitu [62].



Graf 10 Antioxidační aktivita vybraných extraktů

V literatuře [2, 44] se pro stanovení antiradikálové aktivity využívá metoda s DPPH (2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyllovým radikálem). Tsai a spol. [2] uvádí, že schopnost radikálového vychytávání DPPH se úměrně zvyšuje se zvyšováním koncentrace extraktu z *E. purpurea* a může dosahovat až 91 %. Tyto výsledky ale nejsou porovnatelné s hodnotami získanými v této práci.

4.6 Stanovení aromatických látek ve vybraných vzorcích

Pro stanovení aromatických látek pomocí HS-SPME-GC-MS byly použity tři nejlepší získané extrakty a dva komerční vzorky. Také byly analyzovány výchozí suroviny, jak sušený květ, tak i sušený kořen *E. purpurea*. Identifikace sloučenin byla provedena na základě porovnání hmotnostních spekter s dostupnou knihovnou spekter. Získané chromatogramy jsou uvedeny v Přílohách 1–7. Celkem bylo identifikováno 12 skupin sloučenin. Procentuální zastoupení jednotlivých funkčních skupin a jejich podíl na každém vzorku byly vypočteny z ploch píků a vztahem plochy jednoho píku k součtu ploch všech píků na chromatogramu v procentech. Výsledky jsou uvedeny v Tabulce 13 a 14 a v Grafu 11.

Tabulka 13 Procentuální zastoupení jednotlivých skupin sloučenin ve vybraných vzorcích

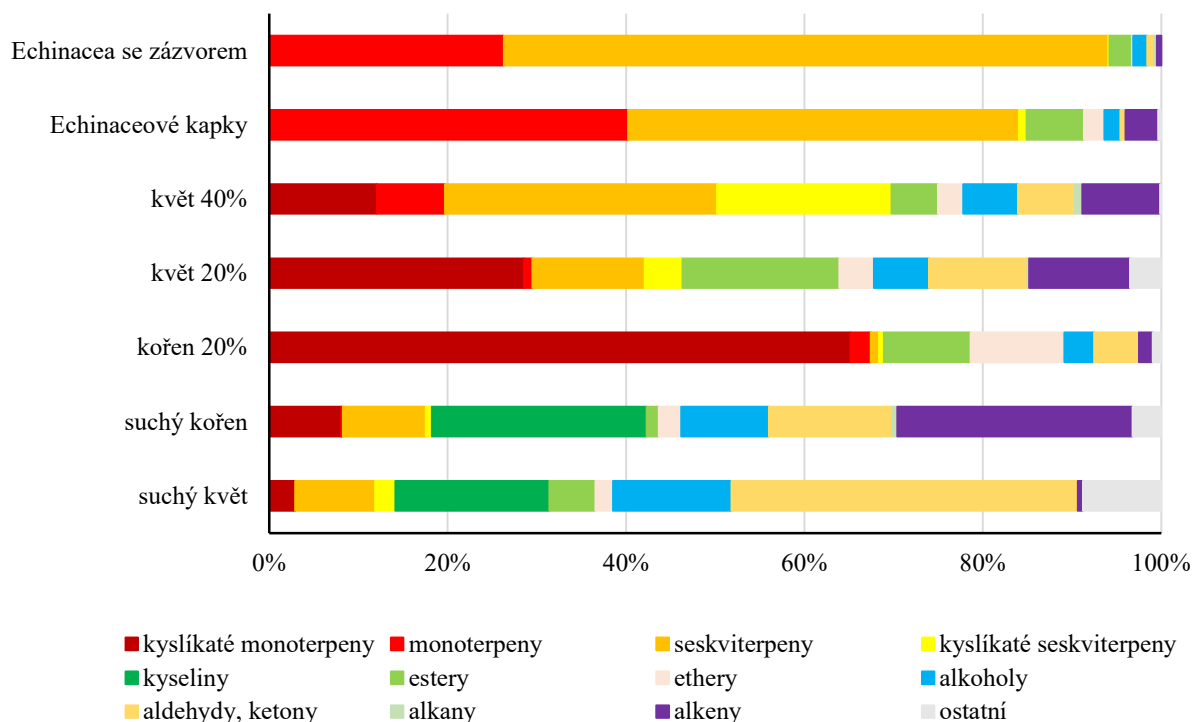
skupina	suchý květ	suchý kořen	kořen 20 %	květ 20 %	květ 40 %	Echinaceové kapky	Echinacea se zázvorem
kyslíkaté monoterpeny	2,9	8,1	65,2	28,6	12,1	0	0
monoterpeny	0	0,2	2,3	1,0	7,6	40,2	26,3
seskviterpeny	9,0	9,3	0,9	12,6	30,5	43,8	67,8
kyslíkaté seskviterpeny	2,2	0,7	0,6	4,3	19,6	0,9	0,1
kyseliny	17,3	24,1	0	0	0	0	0
estery	5,2	1,4	9,7	17,6	5,2	6,4	2,5
ethery	2,0	2,5	10,5	3,9	2,8	2,3	0,2
alkoholy	13,3	9,9	3,3	6,2	6,1	1,8	1,6
aldehydy, ketony	38,8	13,8	5,0	11,0	6,4	0,6	0,8
alkany	0	0,6	0	0,2	0,8	0	0,3
alkeny	0,6	26,4	1,5	11,3	8,7	3,6	0,5
ostatní látky	8,8	3,2	1,0	3,5	0,1	0,4	0

Tabulka 14 Počet aromatických látek podle skupin sloučenin ve vybraných vzorcích

skupina	suchý květ	suchý kořen	kořen 20 %	květ 20 %	květ 40 %	Echinaceové kapky	Echinacea se zázvorem
kyslíkaté monoterpeny	5	4	9	18	15	0	0
monoterpeny	0	1	4	1	3	7	9
seskviterpeny	14	12	1	8	14	15	23
kyslíkaté seskviterpeny	2	1	2	6	10	1	1
kyseliny	5	6	0	0	0	0	0
estery	4	5	9	13	5	6	6
ethery	5	3	3	4	3	1	1
alkoholy	17	12	6	10	9	1	3
aldehydy, ketony	16	14	7	9	12	1	2
alkany	0	1	0	1	1	0	1
alkeny	1	8	2	6	7	1	2
ostatní látky	5	5	2	4	1	1	0
celkem	74	72	45	80	80	34	48

Z grafického znázornění (Graf 11) je patrné, že sušený květ a sušený kořen *E. purpurea* mají podobné složení, ale největší rozdíl je v obsahu alkenů a aldehydů a ketonů. Tyto dva vzorky jako jediné obsahují kyseliny, především kyselinu octovou s celkovým obsahem přes 12 %. Dále obě sloučeniny obsahují vysoké množství hexanalu, nonanalu a karvonu. V obou případech bylo identifikováno více než 70 sloučenin, jak je uvedeno v Tabulce 14. Mazza a spol. [35] zkoumali těkavé látky kořenů, stonků, listů i květů různých druhů echinacey. Podle

nich kořen *E. purpurea* obsahuje 41 % aldehydů, 21 % terpenoidů, 12 % uhlovodíků, 4 % alkoholů, 2 % esterů a 20 % ostatních látek. U květu *E. purpurea* uvádí 83 % terpenoidů, 9 % aldehydů, 4 % alkoholů, 1 % esterů a 3 % ostatních látek. Takto velký rozdíl, především u květů, může být způsobený úpravou vzorku pro analýzu. V této diplomové práci byly použity sušené části rostlin, kdežto Mazza a spol. použili čerstvé části rostlin, které byly rozemlety a proplachovány proplachovacím plynem po dobu 10 minut.



Graf 11 Procentuální zastoupení jednotlivých skupin sloučenin v analyzovaných vzorcích

Extrakt z kořene obsahuje téměř 70 % terpenů, hlavně se jedná o kyslíkaté deriváty monoterpenů. Nejvyšší množství bylo zaznamenáno pro isomenthon (21,85 %), karvon (15,45 %) a levomenthol (13,63 %). Celkem bylo v tomto vzorku identifikováno 45 sloučenin, což je o 27 látek méně než ve vzorku sušeného kořene.

20% extrakt z květu obsahuje pouze 46,3 % terpenů, což je nejnižší množství ze všech testovaných extraktů. Tímto se potvrdilo, že 40% ethanol je lepší extrakční činidlo pro květy *E. purpurea*. Největší zastoupení bylo zaznamenáno u látek: ethyldekanoát (9,29 %), kadina-1(10),4-dien (7,22 %), menthon (6,66 %) a thuja-2,4(10)-dien (6,29 %). U obou extraktů z květu bylo shodně identifikováno 80 sloučenin.

V 40% extraktu z květu se nachází 69,8 % terpenů. Tato hodnota je velmi blízká hodnotě stanovené pro extrakt z kořene, avšak v tomto případě se nejedná o převahu monoterpenů, ale seskviterpenů. Mezi tyto seskviterpeny a jejich deriváty patří kadina-1(10),4-dien (s obsahem 14,71 %), salvial-4(14)-en-1-on (5,77 %) a 1,5-epoxysalvial-4(14)-en (5,76 %). Další rozdíl mezi těmito extrakty je v obsahu dalších látek. Extrakt z kořene obsahuje významně více esterů a etherů, na druhou stranu extrakt z květu obsahuje více alkenů.

Komerční vzorek Echinaceové kapky obsahuje o 16 % více terpenů než extrakt z kořene a o 15,1 % více než 40% extrakt z květu. Celkově se nachází v těchto kapkách 84,9 % všech terpenů. Z 34 nalezených sloučenin, 22 sloučenin bylo identifikováno jako terpenové

uhlovodíky a pouze 1 sloučenina jako terpenoid. Mezi zástupce monoterpenů s nejvyšším obsahem patří o-cymen (16,15 %) a pinen (15,83 %). U seskviterpenů se jedná o kadina-1(10),4-dien (s obsahem 22,32 %) a α -muurolen (s obsahem 5,99 %).

U druhého komerčního vzorku Echinacea se zázvorem byl zjištěn nejvyšší obsah terpenů, a sice 94,2 %. Toto zvýšení obsahu může být připisováno opět složení tohoto vzorku. Zázvorový extrakt obsahuje až 50 % seskviterpenů [62]. V největším množství se objevuje zingiberen (5,44 %), který se nenachází v echinaceji. Mezi terpeny, které se ale v echinaceji nacházejí a bylo u nich zjištěno velké množství, patří seskvithujen (s obsahem 12,73 %), α -kurkumen (s obsahem 11,59 %) a γ -kurkumen (s obsahem 10,16 %).

Literární údaje o složení aromatických látek v alkoholových extraktech z echinacey nejsou dostupné.

5 ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce byla příprava alkoholových extraktů rostlinného materiálu třapatkovky nachové (*Echinacea purpurea*) ve vhodném extrakčním systému (rozpouštědlo, čas, navážka, teplota) a stanovení obsahu účinných látek. Pro experiment byly použity dvě části rostliny, a sice sušený květ a sušený kořen.

Všechny parametry optimalizace byly sledovány pomocí stanovení obsahu celkových fenolických látek spektrofotometrickou metodou pomocí Folin-Ciocalteuova činidla. Jako první byla provedena optimalizace rozpouštědla a času. Jako rozpouštědlo byla testována voda a ethanol o různých koncentracích, konkrétně 20, 40, 60, 80 a 96 %. Pro sušený květ *E. purpurea* bylo stanoveno jako nejlepší rozpouštědlo 40% ethanol, pro sušený kořen *E. purpurea* 20% ethanol. Zároveň v tomto kroku byla testována doba extrakce od 5 minut do 53 dní. Nejvyšších hodnot u sušeného květu bylo dosaženo po 6 hodinách macerace. U sušeného kořene byla optimální doba extrakce stanovena na 24 hodin. Konkrétní nejlepší koncentrace ethanolu byla použita v dalších krocích optimalizace.

Jako druhá byla stanovena optimální navážka sušeného materiálu. Celkem byly prověřeny čtyři poměry rostlinného materiálu ku rozpouštědlu, a sice v poměru 1:40, 1:20, 1:13 a 1:10. Poměr 1:10 byl stanoven jako nejvhodnější jak pro sušený květ, tak i pro sušený kořen.

Posledním testovaným parametrem byla teplota extrakce. Dohromady bylo testováno pět teplot, a sice laboratorní teplota (= 23 °C) a dále zvýšená teplota (30 °C, 40 °C, 50 °C a 60 °C). Hlavně z ekonomického hlediska byla pro obě části rostliny *E. purpurea* jako optimální teplota vyhodnocena laboratorní teplota.

Po stanovení nejvhodnějšího extrakčního systému byly připraveny 3 nejlepší extrakty, s konkrétními podmínkami:

- sušený květ, 40% ethanol, doba extrakce 6 hodin, poměr sušeného materiálu ku rozpouštědlu 1:10, laboratorní teplota,
- sušený květ, 20% ethanol, doba extrakce 6 hodin, poměr sušeného materiálu ku rozpouštědlu 1:10, laboratorní teplota,
- sušený kořen, 20% ethanol, doba extrakce 24 hodin, poměr sušeného materiálu ku rozpouštědlu 1:10, laboratorní teplota.

Pro porovnání připravených extraktů byly testovány i dva komerční vzorky. U těchto pěti vzorků byl nejprve zjišťován obsah celkových fenolických látek spektrofotometrickou metodou pomocí Folin-Ciocalteuova činidla. Množství těchto látek bylo stanoveno v rozmezí od 0,799 do 0,839 mg/ml. Následně byla testována antioxidační aktivita spektrofotometricky pomocí kation-radikálu ABTS⁺. Tato aktivita byla stanovena v rozmezí 116–242 µg troloxu na 1 ml extraktu.

Nakonec byla pro analýzu aromatických látek použita metoda headspace mikroextrakce tuhou fází ve spojení s plynovou chromatografií s hmotnostní detekcí (HS-SPME-GC-MS). K této analýze byly použity tři nejlepší extrakty, dva komerční vzorky a také obě sušené části rostliny. Počet identifikovaných látek se pohybuje od 34 do 80. Všechny tyto látky byly rozděleny do skupin podle funkční skupiny sloučeniny. Celkem bylo identifikováno 12 skupin sloučenin, a sice monoterpeny a jejich kyslíkaté deriváty, seskviterpeny a jejich kyslíkaté deriváty, kyseliny, estery, ethery, alkoholy, aldehydy a ketony, alkany, alkeny a ostatní látky.

Z výsledků této analýzy je patrný rozdíl v chemickém složení kořene a květu *E. purpurea*. Největší rozdíl je v obsahu alkenů a aldehydů a ketonů. Také pouze u těchto dvou vzorků byly identifikovány kyseliny. U extraktů byly jako hlavní obsahové látky identifikovány terpeny s obsahem v rozmezí 46,3–94,2 %, estery s obsahem v rozmezí 2,5–17,6 % a ethery s obsahem v rozmezí 0,2–10,5 %.

V další práci by bylo vhodné celý proces extrakce dále optimalizovat z hlediska doby macerace. Bylo by vhodné sledovat obsah fenolických látek v kratších, například 2hodinových intervalech mezi šestou a dvacátou čtvrtou hodinou a také ve 24hodinových intervalech mezi prvním a sedmým dnem. Dalšími faktory, které by bylo vhodné prozkoumat, jsou vliv míchání a opakovaná extrakce. Extrakty z echinacey by také mohly být analyzovány pomocí kapalinové chromatografie pro identifikaci jednotlivých fenolických kyselin, obzvláště derivátů kyseliny kávové, které mají antioxidační vlastnosti.

6 ZDROJE

- [1] SCHAR, Douglas. Echinacea: rostlina, která posílí váš imunitní systém: léky z přírody. Hodkovičky: Pragma, [1999]. ISBN 80-720-5110-5.
- [2] TSAI, Yu-Ling, Shiow-Ying CHIOU, Kung-Chi CHAN, Jih-Min SUNG a Sheng-Dun LIN. Caffeic acid derivatives, total phenols, antioxidant and antimutagenic activities of Echinacea purpurea flower extracts. *LWT - Food Science and Technology*. 2012, **46**(1), 169-176. DOI: 10.1016/j.lwt.2011.09.026. ISSN 00236438. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0023643811003379>
- [3] RAUSCH, Andrea a Brigitte LOTZ, VĚTVIČKA, Václav, ed. *Bylinky: nejznámější bylinky od A do Z: kuchyně, kosmetika, zdraví*. 5. vyd. Čestlice: Rebo, 2014. ISBN 978-80-255-0833-6.
- [4] BRUNI, Renato, Virginia BRIGHENTI, Lindsay K. CAESAR, Davide BERTELLI, Nadja B. CECH and Federica PELLATI. 2018. Analytical methods for the study of bioactive compounds from medicinally used Echinacea species. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 160, 443-477.
- [5] KUŽEL, Stanislav. *Technologie pěstování a zpracování Echinacea purpurea na extrakt s požadovanými prvky jakosti a podklady pro jeho certifikaci: vědecká monografie*. V Českých Budějovicích: Jihočeská univerzita, Zemědělská fakulta, 2008. Malotechnologie. ISBN 978-80-7394-103-1.
- [6] Třapatkovka nachová: Echinacea purpurea. In: *Biological Library* [online]. c1999-2019 [cit. 2019-04-10]. Dostupné z: <https://www.biolib.cz/cz/taxon/id62261/>
- [7] KOCOURKOVÁ, Blanka, Helena PLUHÁČKOVÁ a Miroslav HABÁN. *Léčivé, aromatické a kořeninové rostliny a základy fytoterapie*. Brno: Mendelova univerzita v Brně, 2015. ISBN 978-80-7509-351-6.
- [8] PURPLE CONEFLOWER, ECHINACEA PURPUREA. In: *Theseedcompany.ca* [online]. [cit. 2019-05-27]. Dostupné z: <https://theseedcompany.ca/products/purple-coneflower-echinacea-purpurea>
- [9] Třapatka úzkolistá. In: *Www.zahradnictvi-flos.cz* [online]. [cit. 2019-05-27]. Dostupné z: <https://www.zahradnictvi-flos.cz/echinacea-angustifolia-trapatka-uzkolista.html>
- [10] Echinacea pallida. 2001-. In: Wikipedia: the free encyclopedia [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation. Available at: [https://en.wikipedia.org/wiki/Echinacea_pallida#/media/File:Echinacea_pallida_\(8\).jpg](https://en.wikipedia.org/wiki/Echinacea_pallida#/media/File:Echinacea_pallida_(8).jpg)

- [11] TŮMOVÁ, Lenka. Echinacea – terapeutické účinky a možné interakce. *Praktické lékárenství*. 2012, **8**(5), 246-248. ISSN 1801-2434.
- [12] BARNES, Joanne, Linda A. ANDERSON, Simon GIBBONS a J. David PHILLIPSON. Echinacea species (Echinacea angustifolia (DC.) Hell., Echinacea pallida (Nutt.) Nutt., Echinacea purpurea (L.) Moench): a review of their chemistry, pharmacology and clinical properties. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2005, **57**(8), 929-954. DOI: 10.1211/0022357056127. ISSN 00223573. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1211/0022357056127>
- [13] PERCIVAL, Susan S. Use of echinacea in medicine. *Biochemical Pharmacology*. 2000, **60**(2), 155-158. DOI: 10.1016/S0006-2952(99)00413-X. ISSN 00062952. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S000629529900413X>
- [14] SHARIFI-RAD, Mehdi, Dima MNAYER, Maria Flaviana Bezerra MORAIS-BRAGA, et al. Echinacea plants as antioxidant and antibacterial agents: From traditional medicine to biotechnological applications. *Phytotherapy Research*. 2018, **32**(9), 1653-1663. DOI: 10.1002/ptr.6101. ISSN 0951418X. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/ptr.6101>
- [15] DUŠKOVÁ, Miroslava. 2014. Analytické přístupy ke stanovení a identifikaci flavonoidů. Praha. Bakalářská práce. Univerzita Karlova v Praze. Vedoucí práce Prof. RNDr. Jiří Hudeček, CSc.
- [16] OLTHOF, Margreet R., Peter C. H. HOLLMAN and Martijn B. KATAN. 2001. Chlorogenic Acid and Caffeic Acid Are Absorbed in Humans. *The Journal of Nutrition*. 131(1), 66-71.
- [17] LEE, Jungmin. 2010. Caffeic acid derivatives in dried Lamiaceae and Echinacea purpurea products. *Journal of Functional Foods*. 2(2), 158-162.
- [18] Structure of caffeic acid. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001- [cit. 2019-06-04]. Dostupné z: https://cs.wikipedia.org/wiki/Kyselina_k%C3%A1vov%C3%A1#/media/File:Kaffees%C3%A4ure.svg
- [19] CLIFFORD, Michael N. 2000. Chlorogenic acids and other cinnamates: nature, occurrence, dietary burden, absorption and metabolism. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 80(7), 1033-1043.

- [20] National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. Caftaric acid, CID=6440397, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Caftaric-acid> (accessed on Aug. 5, 2019)
- [21] Skeletal formula of caftaric acid. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001- [cit. 2019-08-04]. Dostupné z: https://en.wikipedia.org/wiki/Caftaric_acid#/media/File:Caftaric_acid.svg
- [22] INNOCENTI, Marzia, Sandra GALLORI, Catia GIACCHERINI, Francesca IERI, Franco F. VINCIERI and Nadia MULINACCI. 2005. Evaluation of the Phenolic Content in the Aerial Parts of Different Varieties of Cichorium intybus L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53(16), 6497-6502.
- [23] PENG, Ye, Quancai SUN a Yeonhwa PARK. The Bioactive Effects of Chicoric Acid As a Functional Food Ingredient. *Journal of Medicinal Food*. 2019, 22(7), 645-652. DOI: 10.1089/jmf.2018.0211. ISSN 1096-620X. Dostupné také z: <https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/jmf.2018.0211>
- [24] Structure of chicoric acid. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001- [cit. 2019-08-04]. Dostupné z: https://en.wikipedia.org/wiki/Chicoric_acid#/media/File:Chicoric_acid.svg
- [25] National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. Chlorogenic acid, CID=1794427, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Chlorogenic-acid> (accessed on Aug. 5, 2019)
- [26] TAJIK, Narges, Mahboubah TAJIK, Isabelle MACK and Paul ENCK. 2017. The potential effects of chlorogenic acid, the main phenolic components in coffee, on health: a comprehensive review of the literature. *European Journal of Nutrition*. 56(7), 2215-2244.
- [27] Chemical structure of chlorogenic acid. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001- [cit. 2019-08-04]. Dostupné z: https://cs.wikipedia.org/wiki/Kyselina_chlorogenov%C3%A1#/media/Soubor:Chlorogenic-acid-2D.svg
- [28] BUNDY, Rafe, Ann F. WALKER, Richard W. MIDDLETON, Carol WALLIS and Hugh C.R. SIMPSON. 2008. Artichoke leaf extract (*Cynara scolymus*) reduces plasma cholesterol in otherwise healthy hypercholesterolemic adults: A randomized, double blind placebo controlled trial. *Phytomedicine*. 15(9), 668-675.
- [29] KRAFT, K. 1997. Artichoke leaf extract — Recent findings reflecting effects on lipid metabolism, liver and gastrointestinal tracts. *Phytomedicine*. 4(4), 369-378.

- [30] National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. Cynarine, CID=5281769, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Cynarine> (accessed on Aug. 5, 2019)
- [31] Structural diagram of cynarine. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001- [cit. 2019-08-04]. Dostupné z: <https://cs.wikipedia.org/wiki/Cynarin#/media/Soubor:Cynarine.svg>
- [32] JIA, Cunqin, Haiming SHI, Xiangmei WU, Yinzeng LI, Jingjing CHEN and Pengfei TU. 2006. Determination of echinacoside in rat serum by reversed-phase high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection and its application to pharmacokinetics and bioavailability. *Journal of Chromatography B*. 844(2), 308-313.
- [33] Echinacoside. In: *LKT Labs: Biochemicals for Life Science Research* [online]. c2019 [cit. 2019-08-04]. Dostupné z: <https://lktlabs.com/product/echinacoside/>
- [34] MIRJALILI, Mohammad Hossein, Peyman SALEHI, Hassanali Naghdi BADI and Ali SONBOLI. 2006. Volatile constituents of the flowerheads of three Echinacea species cultivated in Iran. *Flavour and Fragrance Journal*. 21(2), 355-358.
- [35] MAZZA, G. and T. COTTRELL. 1999. Volatile Components of Roots, Stems, Leaves, and Flowers of Echinacea Species †. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 47(8), 3081-3085.
- [36] VOLF, Karel a František ANDRS. *Flavonoidy a jejich biologické působení*. 2. vydání. Praha: n.s., 2015. ISBN 978-80-254-4225-8.
- [37] CLASSEN, B., S.-L. MAU and A. BACIC. 2005. The Arabinogalactan-Proteins from Pressed Juice of Echinacea purpurea Belong to the "Hybrid" Class of Hydroxyproline-Rich Glycoproteins. *Planta Medica*. 71(1), 59-66.
- [38] THUDE, S., B. CLASSEN, W. BLASCHEK, D. BARZ and H. THUDE. 2006. Binding studies of an arabinogalactan-protein from Echinacea purpurea to leucocytes. *Phytomedicine*. 13(6), 425-427.
- [39] DAVID, Sholto and Rebecca CUNNINGHAM. 2019. Echinacea for the prevention and treatment of upper respiratory tract infections: A systematic review and meta-analysis. *Complementary Therapies in Medicine*. 44, 18-26.
- [40] ROESLER, Joachim, Andreas EMMENDÖRFFER, Christiane STEINMÜLLER, Birgit LUETTIG, Hildebert WAGNER and Marie-Luise LOHMANN-MATTHES. 1991. Application of purified polysaccharides from cell cultures of the plant Echinacea

purpurea to test subjects mediates activation of the phagocyte system. *International Journal of Immunopharmacology*. 13(7), 931-941.

- [41] SEE, Darryl M., Nikki BROUMAND, Lisa SAHL and Jeremiah G. TILLES. 1997. In vitro effects of echinacea and ginseng on natural killer and antibody-dependent cell cytotoxicity in healthy subjects and chronic fatigue syndrome or acquired immunodeficiency syndrome patients. *Immunopharmacology*. 35(3), 229-235.
- [42] YILDIZ, Ece, Dilan KARABULUT and Ozlem YESIL-CELIK TAS. 2014. A bioactivity based comparison of Echinacea purpurea extracts obtained by various processes. *The Journal of Supercritical Fluids*. 89, 8-15.
- [43] ERENLER, Ramazan, Isa TELCI, Musa ULUTAS, Ibrahim DEMIRTAS, Fatih GUL, Mahfuz ELMASTAS and Omer KAYIR. 2015. Chemical Constituents, Quantitative Analysis and Antioxidant Activities of Echinacea purpurea (L.) Moench and Echinacea pallida (Nutt.) Nutt. *Journal of Food Biochemistry*. 39(5), 622-630.
- [44] LEPOJEVIĆ, Ivana, Žika LEPOJEVIĆ, Branimir PAVLIĆ, Mihailo RISTIĆ, Zoran ZEKOVIĆ and Senka VIDOVIĆ. 2017. Solid-liquid and high-pressure (liquid and supercritical carbon dioxide) extraction of Echinacea purpurea L. *The Journal of Supercritical Fluids*. 119, 159-168.
- [45] BAUER, R., I. KHAN and H. WAGNER. 1988. TLC and HPLC Analysis of Echinacea pallida and E. angustifolia Roots 1. *Planta Medica*. 54(05), 426-430.
- [46] BERGERON, Chantal and Stefan GAFNER. 2008. Quantitative Analysis of the Polysaccharide and Glycoprotein Fractions in Echinacea purpurea . and Echinacea angustifolia . by HPLC-ELSD for Quality Control of Raw Material. *Pharmaceutical Biology*. 45(2), 98-105.
- [47] NYALAMBISA, M., I.A. OYEMITAN, R. MATEWU, O.O. OYEDEJI, O.S. OLUWAFEMI, S.P. SONGCA, B.N. NKEH-CHUNGAG and A.O. OYEDEJI. 2017. Volatile constituents and biological activities of the leaf and root of Echinacea species from South Africa. *Saudi Pharmaceutical Journal*. 25(3), 381-386.
- [48] POMPONIO, Romeo, Roberto GOTTI, Mohammad HUDAIB and Vanni CAVRINI. 2002. Analysis of phenolic acids by micellar electrokinetic chromatography: application to Echinacea purpurea plant extracts. *Journal of Chromatography A*. 945(1-2), 239-247.
- [49] GOTTI, R., Pomponio, R., Bertucci, C., & Cavrini, V. (2002). Simultaneous analysis of the lipophilic and hydrophilic markers of echinacea plant extracts by capillary electrophoresis. *Journal of Separation Science*, 25(15-17), 1079-1086. doi:10.1002/1615-9314(20021101)25:15/17<1079::AID-JSSC1079>3.0.CO;2-0

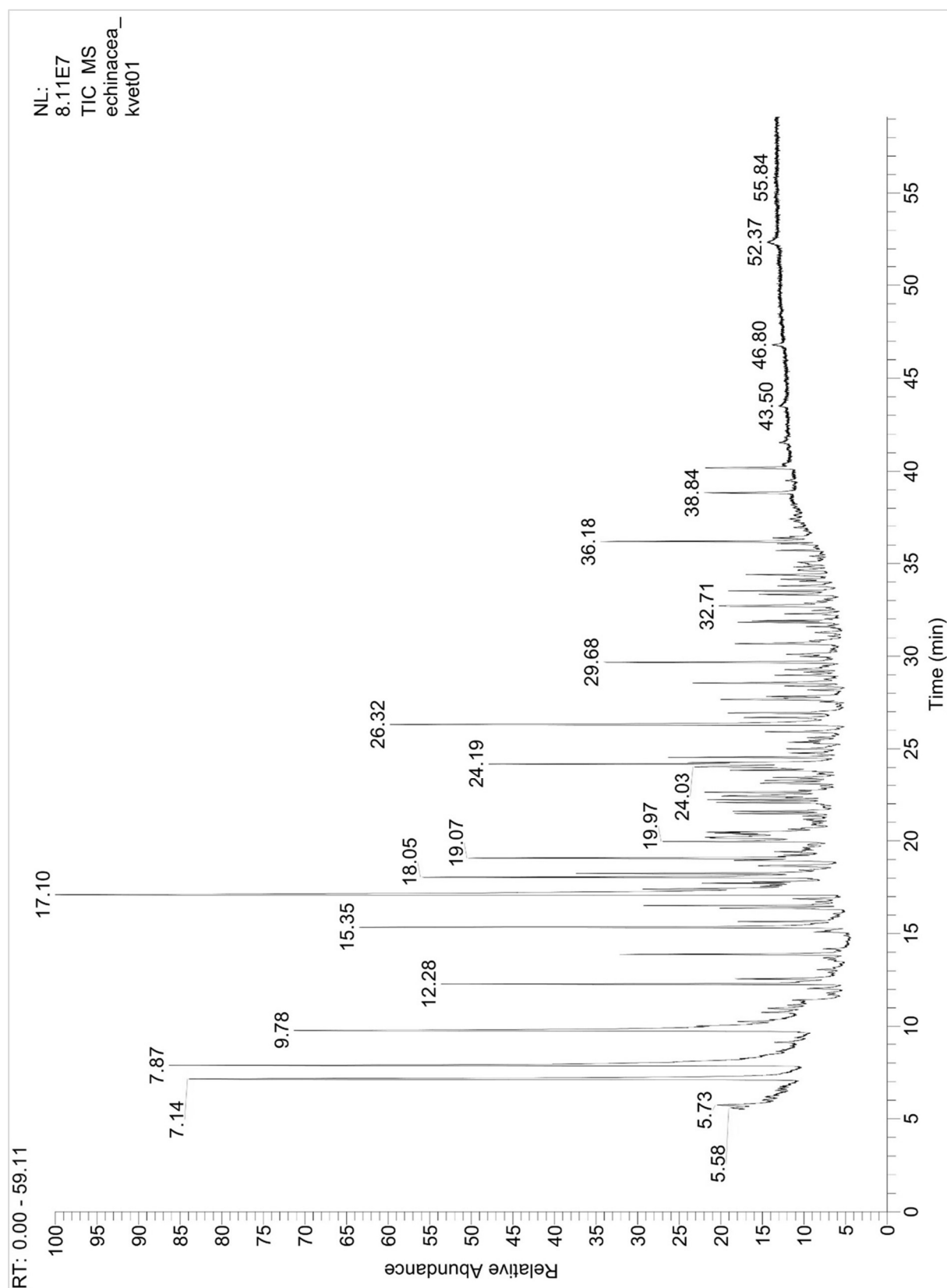
- [50] MANCEK, B and S KREFT. 2005. Determination of cichoric acid content in dried press juice of purple coneflower () with capillary electrophoresis. *Talanta*. 66(5), 1094-1097.
- [51] SCHULZ, Hartwig, Sven PFEFFER, Rolf QUILITZSCH, Boris STEUER and Klaus REIF. 2002. Rapid and Non-Destructive Determination of the Echinacoside Content in Echinacea Roots by ATR-IR and NIR Spectroscopy. *Planta Medica*. 68(10), 926-929.
- [52] LAASONEN, Magali, Tuulikki HARMIA-PULKKINEN, Christine L. SIMARD, Erik MICHIELS, Markku RÄSÄNEN and Heikki VUORELA. 2002. Fast Identification of Echinacea purpurea Dried Roots Using Near-Infrared Spectroscopy. *Analytical Chemistry*. 74(11), 2493-2499.
- [53] SANDASI, Maxleene, Ilze VERMAAK, Weiyang CHEN and Alvaro VILJOEN. 2014. Hyperspectral Imaging and Chemometric Modeling of Echinacea — A Novel Approach in the Quality Control of Herbal Medicines. *Molecules*. 19(9), 13104-13121.
- [54] Rozlišení doplňků stravy od léčivých přípravků. 2010. Státní ústav pro kontrolu léčiv [online]. Praha. [cit. 2019-11-04] Available at: <http://www.sukl.cz/leciva/rozliseni-doplнку-stravy-od-lecivych-pripravku>
- [55] ČESKO. § vyhláška č. 58/2018 Sb., vyhláška o doplňcích stravy a složení potravin. In: *Zákony pro lidi.cz* [online]. Dostupné z: <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/2018-58#Top>
- [56] Zdravotní tvrzení. 2013. In: Státní zdravotní ústav [online]. Praha. Available at: <http://www.szu.cz/tema/bezpecnost-potravin/zdravotni-tvrzeni>
- [57] Echinaceové kapky. In: AROMATICA [online]. Available at: <https://www.aromatica.cz/produkt/echinaceove-kapky/>
- [58] Echinacea se zázvorem. In: AROMATICA [online]. Available at: <https://www.aromatica.cz/produkt/echinaceove-kapky-se-zazvorem/>
- [59] MAŇÁKOVÁ, Adriena. 2019. Ověření metody stanovení alergenních vonných látek v nečokoládových cukrovinkách. Brno. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně. Vedoucí práce Doc. Ing. Eva Vítová, Ph.D.
- [60] Nařízení Komise (EU) 2018/98 ze dne 22. ledna 2018, kterým se mění přílohy II a III nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1333/2008 a příloha nařízení Komise (EU) č. 231/2012, pokud jde o sorban vápenatý (E 203): (Text s významem pro EHP). 2018. *EFSA Journal*.

- [61] WU, C.H., H.N. MURTHY, E.J. HAHN, H.L. LEE and K.Y. PAEK. 2008. Efficient extraction of caffeic acid derivatives from adventitious roots of *Echinacea purpurea*. Czech Journal of Food Sciences. 26(4), 254-258.
- [62] YEH, Hsiang-yu, Cheng-hung CHUANG, Hsin-chun CHEN, Chu-jen WAN, Tai-liang CHEN and Li-yun LIN. 2014. Bioactive components analysis of two various gingers (*Zingiber officinale* Roscoe) and antioxidant effect of ginger extracts. LWT - Food Science and Technology. 55(1), 329-334.

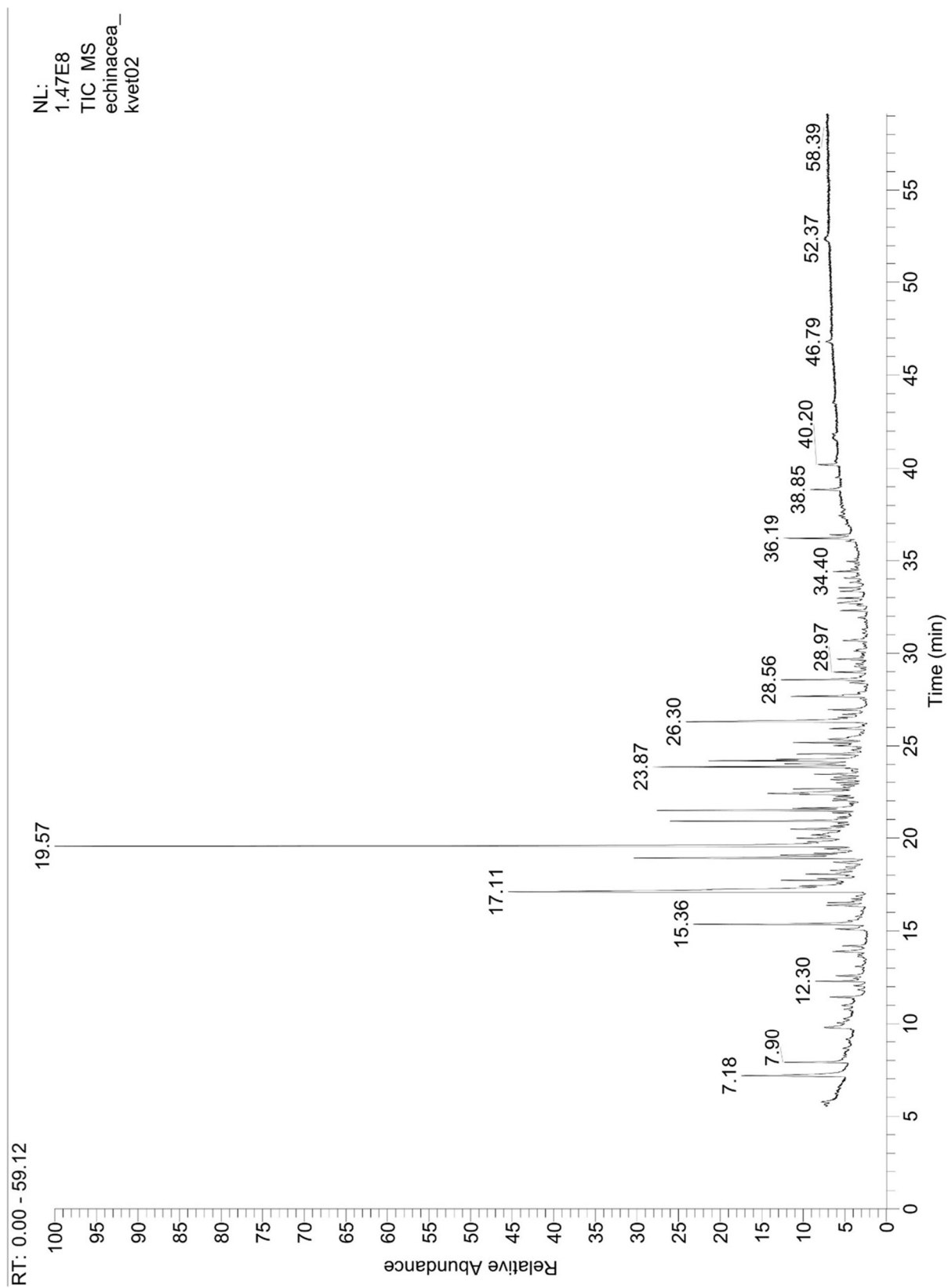
7 SEZNAM PŘÍLOH

- Příloha 1 Plynový chromatogram sušeného květu *E. purpurea*
- Příloha 2 Plynový chromatogram sušeného kořene *E. purpurea*
- Příloha 3 Plynový chromatogram 20 % extraktu z kořene
- Příloha 4 Plynový chromatogram 20 % extraktu z květu
- Příloha 5 Plynový chromatogram 40 % extraktu z květu
- Příloha 6 Plynový chromatogram Echinaceových kapek Aromatica
- Příloha 7 Plynový chromatogram bylinných kapek Echinacea se zázvorem Aromatica

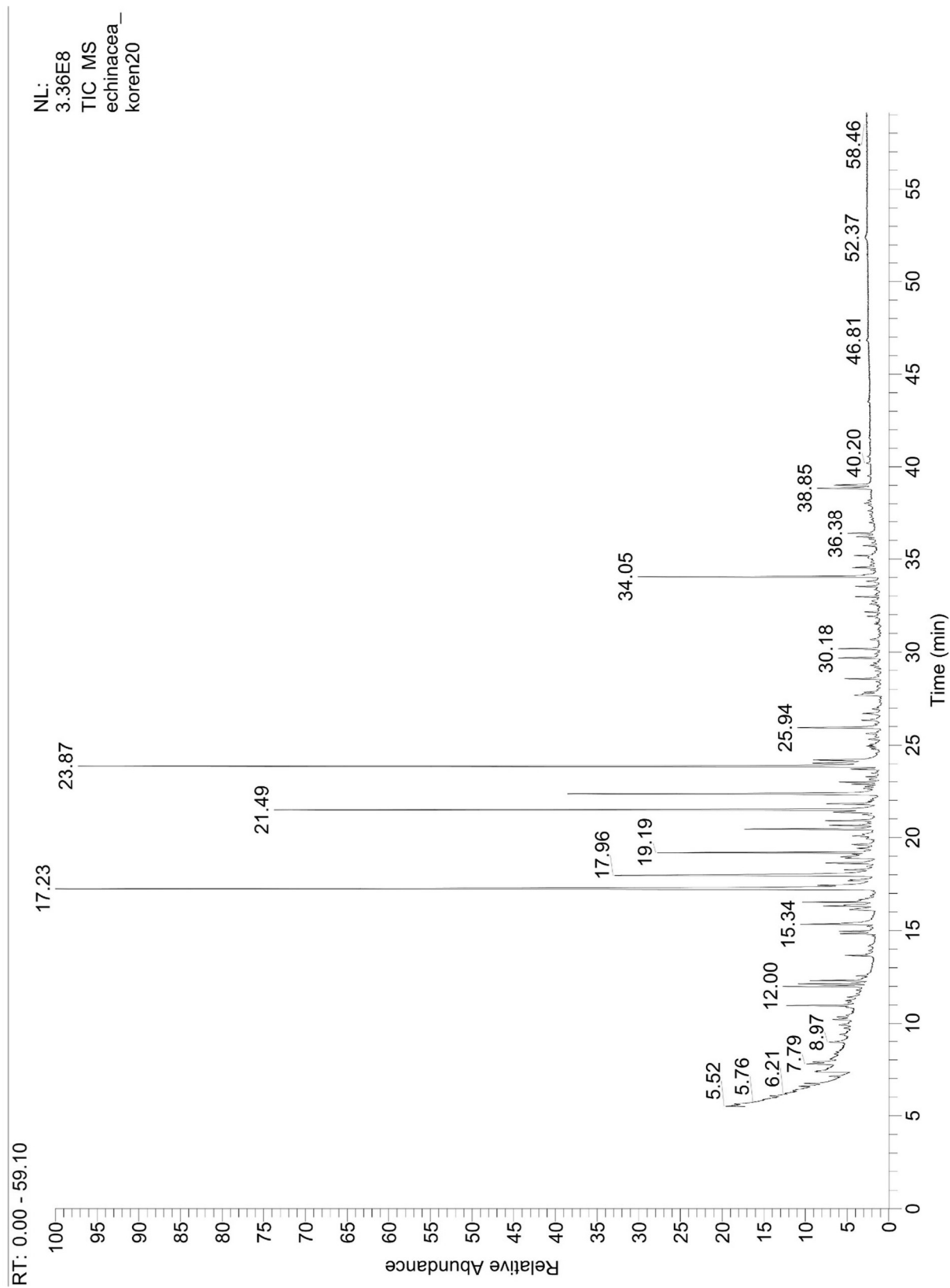
8 PŘÍLOHY



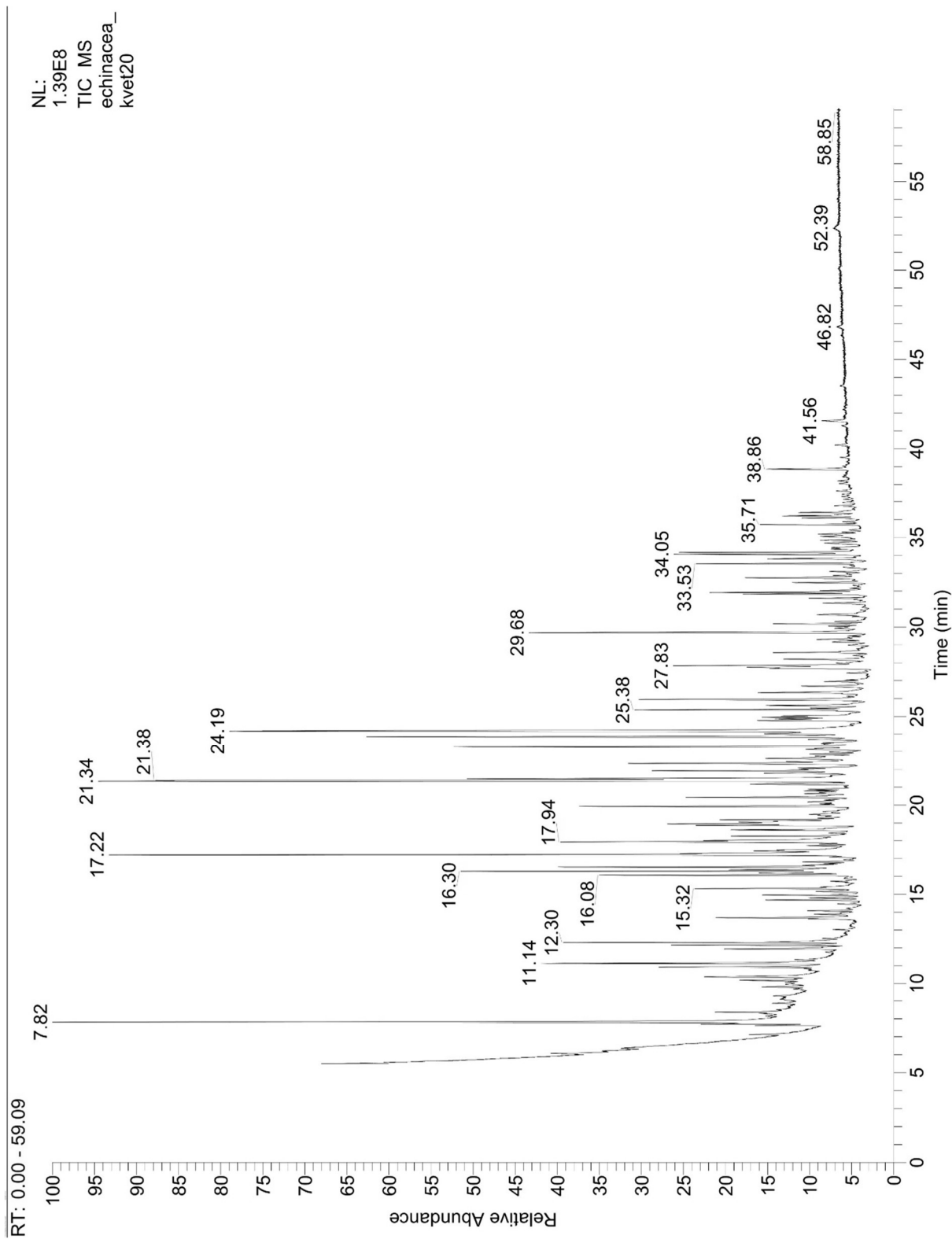
Příloha 1 Plynový chromatogram sušeného květu *E. purpurea*



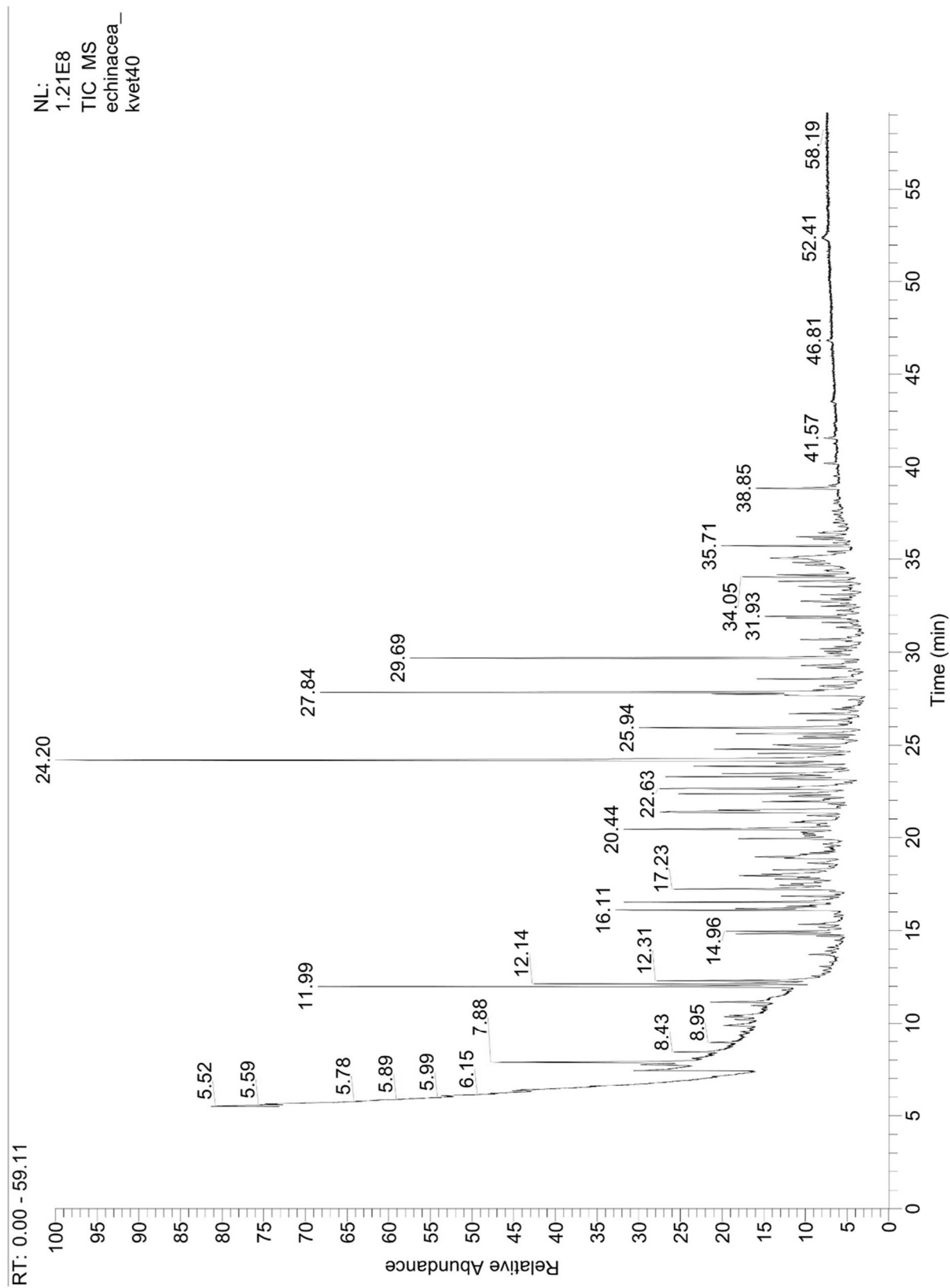
Příloha 2 Plynový chromatogram sušeného kořene *E. purpurea*



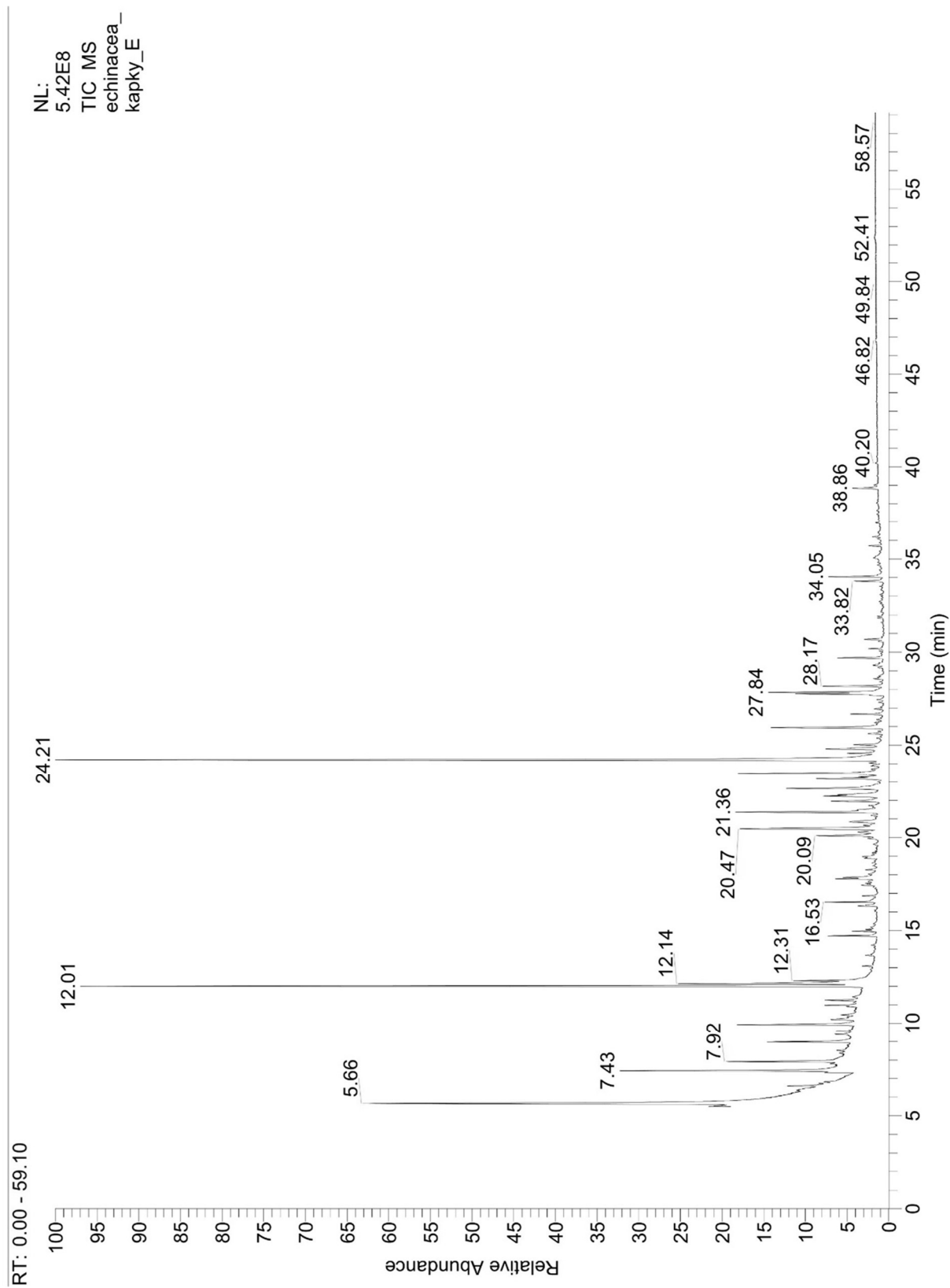
Příloha 3 Plynový chromatogram 20 % extraktu z kořene



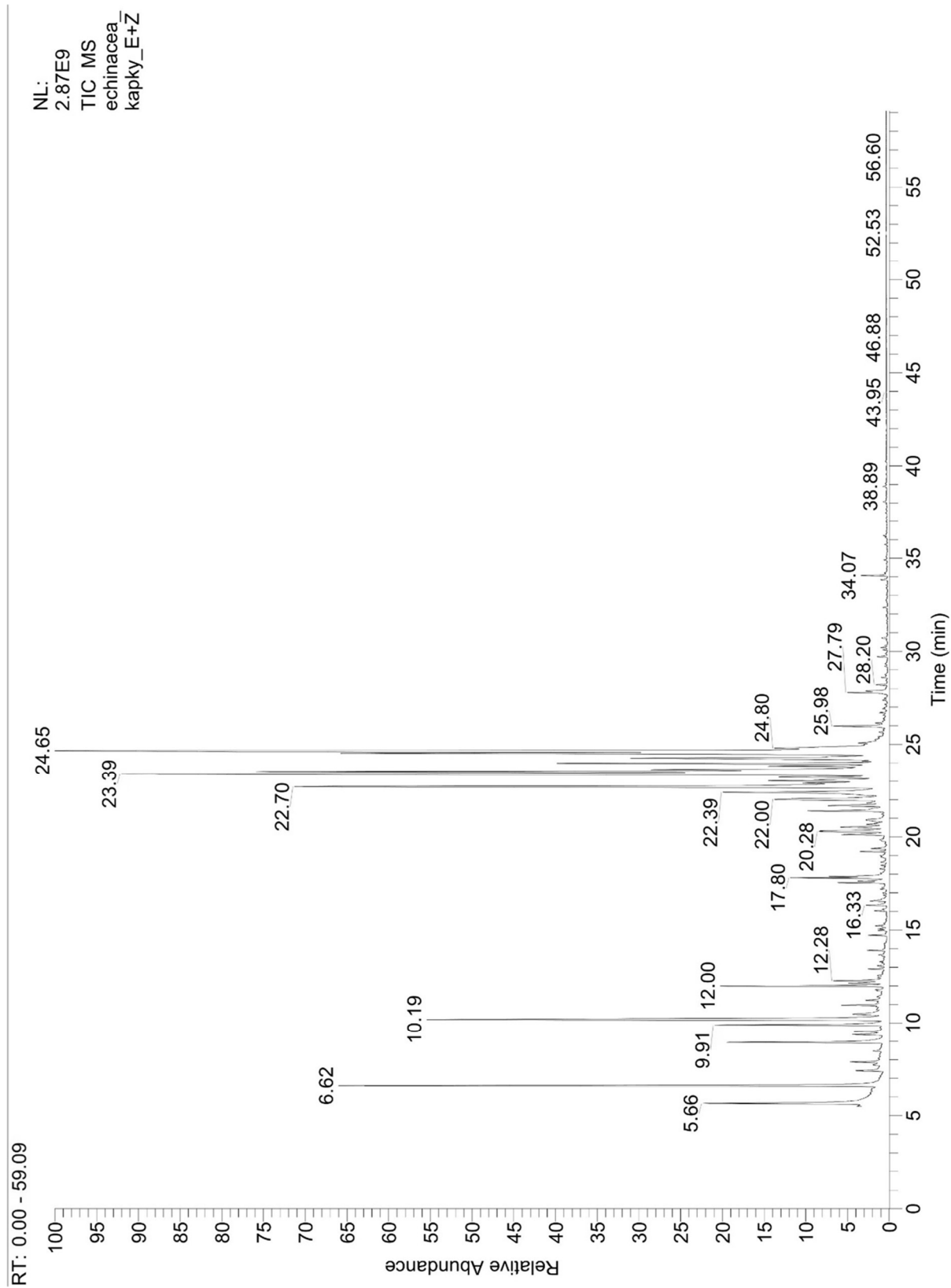
Příloha 4 Plynový chromatogram 20 % extraktu z květu



Příloha 5 Plynový chromatogram 40 % extraktu z květu



Příloha 6 Plynový chromatogram Echinaceových kapek Aromatica



Příloha 7 Plynový chromatogram bylinných kapek Echinacea se zázvorem Aromatica